

Tesis de Posgrado

Maduración de la competencia inmunológica en la rata

Galassi, Nora Virginia

1985

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Galassi, Nora Virginia. (1985). Maduración de la competencia inmunológica en la rata. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1925_Galassi.pdf

Cita tipo Chicago:

Galassi, Nora Virginia. "Maduración de la competencia inmunológica en la rata". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1985.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1925_Galassi.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

"MADURACION DE LA COMPETENCIA
INMUNOLOGICA EN LA RATA"

AUTOR: Lic. Nora Virginia Galassi

DIRECTOR: Dra. Nora Ruth Nota

LUGAR DE TRABAJO: Cátedra de Microbiología, Parasitología e Inmuno-
logía, Facultad de Medicina, U.B.A.

Tesis presentada para optar al título de DOCTOR EN CIENCIAS BIOLOGICAS

1 9 8 5

1925
4 2

A MI ESPOSO ,

A MIS HIJOS .

AGRADECIMIENTOS

- A la Dra. Nora Ruth Nota por su rigor crítico, guía y estímulo constante.

- A la Dra. Marta Rosa Nejamkis por su desinteresada colaboración.

- Al Dr. Julio Azcurra, Consejero de estudios de la Carrera del Doctorado.

- Al Dr. Marcelo J. Frigerio, titular de la Cátedra de Microbiología, Parasitología e Inmunología de la Facultad de Medicina, donde se realizaron estos trabajos.

- A los Dres Eduardo Lascano y Norberto Sanjuan por sus estudios anatomopatológicos.

- A todo el personal de la Cátedra de Microbiología, Parasitología e Inmunología, en especial a mis compañeros de laboratorio.

- A la Sra. Perla Alvarez por su esmerada colaboración en el dactilografiado de este trabajo.

INDICE

ABREVIATURAS	1
1. INTRODUCCION	3
1.1. INMUNIDAD: Antecedentes históricos.....	3
1.2. ONTOGENIA DE LA RESPUESTA INMUNE.....	7
1.2.1. Ontogenia de la síntesis de inmunoglobulinas y res- puesta inmune humoral.....	8
1.2.2. Desarrollo del tejido linfoide	18
1.2.2.1. Maduración de los linfocitos B	21
1.2.2.2. Maduración de linfocitos T	24
1.2.3. Desarrollo ontogenético de la respuesta inmune media da por células	26
1.2.4. Tolerancia inmunológica y maduración	28
1.2.5. Immunobiología de la relación materno-fetal	32
2. OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO	39
2.1. Estudio de las proteínas séricas	40
2.2. Maduración de la respuesta inmune humoral	40
2.3. Inducción de tolerancia.....	41
2.4. Desarrollo de la capacidad de iniciar y/o expresar reacciones de hipersensibilidad	42
2.5. Maduración de la respuesta inmune celular	42
2.6. Estudio de la diferenciación celular	43

2.7. Relación materno-fetal:Inmunidad pasiva natural	43
3. MATERIALES Y METODOS	46
3.1. ANIMALES	46
3.1.1. Ratas	46
3.1.2. Conejos	46
3.1.3. Carnero	46
3.1.4. Cabra	47
3.2. ANTIGENOS (Ag) Y DISEÑO EXPERIMENTAL.....	47
3.2.1. Particulados	47
3.2.1.1. Globulos Rojos de Carnero	47
3.2.2. Solubles	50
3.2.2.1. Albúmina Sérica Bovina (ASB)	50
3.2.2.2. Lipopolisacárido (LPS)	51
3.2.2.3. 2,4-Dinitro-1-fluorbenceno (DNFB).....	52
3.3. VALORACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL	54
3.3.1. Anti - GRC	54
3.3.1.1. Determinación de Ac séricos: Hemaglutinación di- recta	54
3.3.1.2. Determinación del número de células formadoras de Ac	55
3.3.2. Determinación de Ac anti-ASB	56
3.3.3. Determinación de Ac anti-LPS	57
3.4. ESTUDIO DE LAS PROTEINAS SERICAS	57

3.4.1. Concentración total de proteínas séricas.....	57
3.4.2. Análisis de las proteínas séricas por electorforesis en acetato de celulosa	58
3.4.3. Análisis de las proteínas séricas por electroforesis en agarosa	61
3.4.4. Valoración de la concentración de IgG sérica.....	63
3.4.5. Nivel de Complemento sérico.....	64
3.4.5.1. Preparación de la Mezcla Hemolítica (MH)	64
3.4.5.2. Técnica de titulación de Complemento	64
3.5. ESTUDIO DE LAS CELULAS COMPROMETIDAS EN LA RESPUESTA INMUNE.....	66
3.5.1 Recuento y fórmula leucocitarios	66
3.5.2. Análisis del exudado peritoneal	66
3.5.3. Distribución de las poblaciones linfocitarias	67
3.6. ESTUDIOS DE HIPERSENSIBILIDAD MEDIADA POR ANTICUERPOS.	70
3.7. TRANSFERENCIA MATERNO FETAL DE Ac.....	71
3.8. METODOLOGIA EMPLEADA EN LA PREPARACION DE ANTI-SUEROS.	73
3.8.1. Suero de conejo anti-suero total de rata.....	73
3.8.2. Suero de conejo anti- γ - globulina de rata.....	73
3.8.3. Suero de conejo anti-IgG de rata	74
3.8.4. Preparación de suero de conejo anti-timocito de rata (SAT)	76
3.8.5. Preparación de γ -globulina de cabra anti- γ -globu lina de conejo marcada con isotiocianato de fluore- scina	77

3.9. INMUNOELECTROFORESIS (IEF)	78
3.10. PRECIPITACION EN MEDIO LIQUIDO	79
3.11. INMUNO DIFUSION BIDIMENSIONAL EN GEL.....	80
3.12. METODO EMPLEADO PARA LA ADSORCION DEL SAT CON GLOBULOS ROJOS.....	81
3.13. METODO EMPLEADO PARA LA ADSORCIÓN CON POLVO DE HIGADO.	81
3.14. TITULACION DEL SAT POR LA TECNICA DE CITOTOXICIDAD <u>ME</u> DIADA POR COMPLEMENTO	82
3.15. PAP (PEROXIDASA- ANTIPEROXIDASA).....	84
3.16. HISTOLOGIA	84
3.17. ANALISIS ESTADISTICO	85
4. RESULTADOS.....	86
4.1. ESTUDIO DE LAS PROTEINAS SERICAS.....	86
4.1.1. Concentración total de proteínas séricas	86
4.1.2. Análisis de las proteínas séricas	86
4.1.3. Concentración de IgG sérica	95
4.1.4. Nivel de Complemento Sérico	107
4.2. MADURACION DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL.....	107
4.2.1. Antígenos particulados (GRC)	107
4.2.2. Antígenos solubles	123
4.2.2.1. Albúmina sérica bovina (ASB)	123
4.2.2.2. Lipopolisacárido (LPS)	127
4.3. MADURACION DE LA RESPUESTA DE HIPERSENSIBILIDAD MEDIADA POR CELULAS	131

4.4. ESTUDIOS DE HIPERSENSIBILIDAD MEDIADA POR ANTICUERPOS.....	138
4.5. TRANSFERENCIA MATERNO - FETAL DE Ac.....	150
4.6. ESTUDIOS DE LAS CELULAS COMPROMETIDAS EN LA RESPUESTA INMU NE	156
4.6.1. Recuento y Fórmula leucocitarios	156
4.6.2. Análisis del exudado peritoneal	161
4.6.3. Distribución de las poblaciones linfocitarias	165
5. DISCUSION	172
6. CONCLUSIONES	199
BIBLIOGRAFIA	202

ABREVIATURAS

Ac: Anticuerpos

ACF: Adyuvante Completo de Freund

Ag: Antígeno

ASB: Albúmina Sérica Bovina

CFA: Células Formadoras de Anticuerpos

Dd: Dosis desencadenante

DNFB: 2,4-Dinitro-1- fluorbenceno

D.O.: Densidad Óptica

Ds: Dosis sensibilizante

ev: endovenosa

GRC: Glóbulos Rojos de Carnero

HR: Hipersensibilidad Retardada

IEF: Inmunoelectroforesis

id: intradérmica

IDR: Inmunodifusión Radial

im: intramuscular

ip: intraperitoneal

ipl: intraplantar

LPS: Lipopolisacárido

MH: Mezcla Hemolítica

PBS: Buffer Fosfato Salino

pi: post-inoculación

rpm: revoluciones por minuto

SAT: Suero Anti-timocito

sc: subcutánea

SF: Solución Fisiológica

SFB: Suero Fetal Bovino

SNC: Suero Normal de Conejo

1. INTRODUCCION

1.1. INMUNIDAD: Antecedentes históricos

El concepto de inmunidad es antiguo, empírico y deriva de la observación de la resistencia a las infecciones.

Muchos siglos antes del descubrimiento de los gérmenes como agentes responsables de las enfermedades infecciosas se conocía que, en la mayoría de casos el haber padecido una enfermedad infecciosa iba seguido de resistencia a la reinfección.

En el siglo XI, los médicos chinos observaron que la inhalación de las costras provenientes de un enfermo de viruela impedía posteriormente la enfermedad. En el siglo XVIII este método primitivo de inmunización fue llevado a Inglaterra por Pyllarini y Timoni y ampliamente difundido más tarde por Lady Mary Wortley Montagu. La inmunología moderna nace realmente cuando Edward Jenner, (1749-1823) todavía estudiante de Medicina, realiza la primera "vacunación" con las costras de vaccinia confirmando que su vacunación protegía al hombre contra la viruela. Un paso trascendente en el desarrollo ulterior de las inmunizaciones preventivas se debió a Louis Pasteur (1822-1895) quien trabajando con cultivos atenuados del cólera aviario, observó que cuando eran inoculados a gallinas sanas no solamente no padecían enfermedad sino que conferían resistencia a la reinfección.

microorganismo patógeno. Robert Koch, (1843-1910) estudiando la etiología bacteriana de algunas enfermedades infecciosas, descubrió en 1882 el bacilo de la tuberculosis. Al intentar crear una vacuna contra esta enfermedad, describe magistralmente lo que clásicamente se conoce como "fenómeno de Koch" marcando con detalle las diferencias de comportamiento del huésped ante la reintroducción de un agente microbiano y sienta las bases de los mecanismos que actualmente conocemos como hipersensibilidad tardía o inmunidad mediada por células.

En 1888, Roux y Yersin comunicaron que el bacilo de la difteria producía una potente exotoxina soluble la que inoculada experimentalmente por von Behring y Kitasato, en 1890, producía en el suero de los animales una sustancia llamada antitoxina, que neutralizaba la acción de la toxina. Por otra parte, las investigaciones de Pfeiffer y Bordet en 1894 confirmaron las de Nuttall y Buchner que reconocieron en el suero normal una sustancia distinta de los anticuerpos, que también intervenía en la destrucción de las bacterias, que en la actualidad se denomina complemento.

Hasta principios de este siglo, las escuelas francesa y alemana dominaban el campo de la investigación inmunológica. En aquella época, existían dos concepciones divergentes, acerca de

la naturaleza de los fenómenos inmunes a lo largo de las cuales siguió desarrollándose la inmunología: La teoría humoral que basaban los conceptos de protección exclusivamente en la acción de los anticuerpos producidos por las células y la teoría celular, que otorgaban el papel preponderante a las células inflamatorias, que intervenían en las respuestas del huésped frente a una sustancia extraña.

A fines del siglo pasado, Paul Ehrlich (1854-1915) enunció en Enero de 1899 la teoría humoral de la formación de anticuerpos. Esta teoría proponía la existencia de receptores, sobre la superficie de las células vivas, capaces de unirse con sustancias antigénicas, los que, si se producían en exceso podrían ser liberados a la circulación como anticuerpos. Después de publicada esta teoría, los principales esfuerzos de los inmunólogos se dedicaron a la identificación, estudio y función biológica de los factores humorales.

Es de destacar que uno de los campos de la inmunología donde la investigación actual progresa con mayor rapidez es el estudio de los receptores presentes en las células inmunocompetentes.

Metchnikoff (1845-1916) en 1883, casi simultáneamente con Ehrlich desarrolló la teoría celular de la inmunidad. Esta teoría proponía que los fagocitos, células "de limpieza" del organismo, identificaban inicialmente las sustancias extrañas al organismo

y constituían el principal sistema defensivo.

Ya en este siglo Karl Landsteiner (1868-1943) en 1942, en sus trabajos sobre hipersensibilidad retardada enfatizó la participación del sistema linfoide en las reacciones inmunes, demostrando la posibilidad de transferir por células un estado de reactividad.

Resultaría imposible ennumerar los trascendentes aportes realizados en el campo de la inmunología en los últimos 50 años pero no pueden dejar de mencionarse los nombres de Félix Haurowitz, Sir Mac Farland Burnet y Niels Jerne quienes en 1930, 1950 y 1975 respectivamente enunciaron teorías que conmovieron conceptos clásicos sobre el funcionamiento y regulación del sistema inmune. Basadas en ellas se desarrollan todas las investigaciones de la inmunología actual.

1.2. ONTOGENIA DE LA RESPUESTA INMUNE

El conocimiento del desarrollo de la inmunidad desde los puntos de vista ontogenético y filogenético puede sin duda, responder algunos de los interrogantes básicos de la inmunología. En lo que se refiere a la ontogenia es ampliamente conocida la diferencia, en la maduración inmunológica, de las diferentes especies animales. La secuencia de acontecimientos que se desarrollan en la ontogenia de la respuesta inmune sugiere una verdadera adaptación de sus componentes, que es característica de los vertebrados.

Antes de iniciar cualquier estudio ontogenético es necesario definir claramente el concepto de respuesta inmunológica, distinguiendo por un lado la categoría de inmunidad adquirida específica y por otro los mecanismos que están ligados a la inmunidad innata o resistencia inespecífica.

Es muy amplio el conjunto de acontecimientos que están relacionados a una respuesta inmunológica dada. Por lo tanto son muchos los aspectos que deben ser desarrollados cuando se encara el estudio del origen de la inmunidad en términos ontogénicos: maduración de los mecanismos de resistencia inespecífica;

capacidad de producción de inmunoglobulinas durante la vida fetal y neonatal hasta la edad adulta; habilidad para iniciar o expresar respuestas alérgicas; caracterización, cuantificación, variación y distribución de los linfocitos en distintos estadios del desarrollo, así como la posibilidad de inducir un estado de tolerancia; interrelación materno-fetal particularmente la capacidad de transferencia de inmunoglobulinas sea por tejidos fetales y/o leche.

Una breve reseña de los antecedentes que han conducido al conocimiento actual de cada uno de estos aspectos, ayudarán a introducir y comprender los objetivos básicos de este trabajo.

1.2.1. Ontogenia de la síntesis de inmunoglobulinas y respuesta inmune humoral.

Después del año 1945 cuando Longsworth (1) demostró que en los niños recién nacidos el nivel de γ -globulinas era superior al de su madre, comenzaron una serie de estudios relacionados con este tema, ya que hasta este momento se suponía que no había síntesis de inmunoglobulinas en la vida fetal. En base a ellos se pudo demostrar que cuando el feto era inmunizado en diferentes momentos de la gestación, su respuesta inmune activa se desarrollaba muy tempranamente para ciertos antígenos, más tardíamente para otros y en algunos casos recién después del

nacimiento. En general puede afirmarse que, en una especie dada, la adquisición de la competencia inmunológica a diferentes antígenos es muy precisa y depende de las características físico-químicas de éste.

En especies como los bovinos, ovinos y porcinos donde las γ -globulinas no se transfieren a través de la barrera placentaria, el neonato es esencialmente agamaglobulinémico. Estos animales han sido utilizados como modelos para el estudio de la adquisición de la capacidad de sintetizar anticuerpos ya que no se produce interferencia con las inmunoglobulinas maternas. Sin embargo, Franek en 1961 (2) demostró en cerdos recién nacidos la existencia de una γ -globulina de bajo peso molecular producida por mecanismos propios que sería un precursor de los anticuerpos que se formarían más tarde como respuesta a una estimulación antigénica. Los estudios realizados por Segre y Kaeberle en 1962 (3) confirmaron la presencia de pequeñas cantidades de γ -globulinas en cerdos recién nacidos, pero sólo en aquellos animales alimentados con calostro, por lo que se creyó que éstas eran necesarias para iniciar la respuesta inmunológica. Sin embargo Kim y col en 1966 (4) trabajando con cerdos extraídos del útero materno 3-5 días antes de término y por lo tanto libres de gérmenes, "inmunológicamente vírgenes" y además sin ingestión de leche materna, comprobaron que estos animales eran

inmunológicamente competentes si se inducían con antígenos apropiados. Estos autores también demostraron que los cerdos tienen en el momento del nacimiento un componente sérico que llamaron "X" con movilidad electroforética semejante a la 7S γ G, pero an tigénicamente distinta de la 7S γ G específica, cuya concentración permanece constante después de una estimulación antigénica (5). El primer anticuerpo formado específicamente es de la clase 19S llamada 19S γ G, antigénicamente distinta a la 19S γ M, y le sigue en la respuesta una segunda clase de anticuerpo con ca racterísticas de 7S γ G. (6).

El pollo provee un importante modelo experimental para el estudio de la ontogenia de las diferentes clases de inmunoglobulinas debido a la facilidad de manipulación de sus órganos linfoides centrales relacionados con la inmunidad humoral.

Ya a principios de este siglo, se había demostrado que el embrión de pollo no respondía a antígenos derivados de la Escherichia coli. Esta observación fue confirmada y ampliada más tarde por otros investigadores usando una gran variedad de antí genos. Más tarde, los trabajos de Wolfe y Dilks (7) demostraron que, cuando se usaban proteínas séricas como antígenos, los pollos no respondían hasta la cuarta semana de vida, a partir de allí tenía lugar una brusca maduración inmune humoral ya que los

títulos de anticuerpos en pollos inoculados a las 5 semanas eran significativamente mayores que los de los estimulados a las 4 semanas. Estos autores concluyeron que la madurez inmunológica en el pollo se alcanza alrededor de la quinta semana después de la eclosión pero continúa a través de la vida. Por otra parte Van Meter y col. (8) demostraron que el primer anticuerpo que aparece en estos animales, pertenece a la clase IgM el que puede ser detectado alrededor de la tercera semana después de la eclosión y luego la IgG entre la cuarta y quinta semana de vida. Leslie y Martin (9) en 1973 trabajando con embriones demostraron IgM en la bursa de embriones de 14 días de gestación y otra inmunoglobulina a la que llamaron IgY (7, 1S) , a los 21 días de gestación la que puede ser valorada 7 días más tarde en sangre periférica. Los trabajos de Perey y col. (10) también indicaron la presencia de IgA en células precursoras derivadas de la bursa productoras también de IgG.

Varios grupos de investigadores (11) (12) (13), utilizando antígenos proteicos, bacterianos y glóbulos rojos administrados a conejos en distintos momentos de su evolución, concluyeron que estos animales son también inmunológicamente inmaduros en el momento del nacimiento y adquieren la capacidad del adulto alrededor de la cuarta semana de vida.

Otras investigaciones involucraron la estimulación

antigénica en útero directamente, con lo cuál se evita la interrupción de la preñez. Silverstein y col. (14) estimularon cordones fetales de 2 meses de gestación con variados antígenos y encontraron que son capaces de sintetizar anticuerpos de la clase 19S sólo hacia bacteriófagos, ferritina y ovoalbúmina. Los fetos bovinos de 164 días de gestación pueden producir aglutininas contra Leptospira saxkoebing pero los títulos de anticuerpos no alcanzan los niveles hallados en el adulto estimulado en las mismas condiciones y con el mismo antígeno (15). Silverstein y col. (16) describieron la cinética de la respuesta primaria humoral en los fetos de monos Rhesus inoculados "in útero" con glóbulos rojos de carnero entre 73 y 125 días de gestación. Se observaron dos picos máximos, valorando la respuesta por células formadoras de anticuerpos, uno al sexto día y otro entre los 15 y 20 días post-estimulación antigénica tanto para IgM como para IgG, pudiendo provocar una respuesta secundaria después de la segunda dosis antigénica. Los autores concluyeron que los fetos tienen ya la información genética incorporada en la línea germinal.

Merecen atención, los estudios realizados en marsupiales; componen un modelo ideal para el estudio de la ontogenia de la inmunidad ya que terminan su desarrollo embrionario fuera del

útero materno y por lo tanto, en el momento del nacimiento ningún sistema u órgano está bien definido, aunque cumplen algunas funciones vitales. Kalmutz (17), usando bacteriófagos como antígeno encontró síntesis de anticuerpos ya a los 11 días después del nacimiento. Estudios adicionales fueron realizados por La Vía y col. (18) y Rowlands y col. (19), los cuales demostraron la formación de anticuerpos en animales estimulados a partir del octavo día, momento en el cual no es posible observar desarrollo del tejido linfoide ni en bazo ni en nódulos linfáticos. La síntesis de anticuerpos se incrementa notablemente a los 20 días y aún más cerca del día 60, cuando aparece el tejido linfoide bien estructurado en el bazo, con células plasmáticas y nódulos secundarios. Rowlands y col. (20) estudiando la respuesta inmune de la comadreja hacia el bacteriófago ϕ_2 observaron que los primeros anticuerpos detectables son del tipo 13S. La IgM aparece más tarde, cuando los anticuerpos embrionarios han desaparecido.

La secuencia típica de aparición ontogenética de anticuerpos del tipo 19S seguida por la formación de anticuerpos del tipo 7S ha sido reiteradamente confirmada en muchas especies de mamíferos (21) (22) (23).

El estudio sobre la maduración de la respuesta inmune en roedores ha sido encarado utilizando principalmente sistemas

de transferencia celular de animales adultos inmunocompetentes a neonatos singeneicos y viceversa, ya que es difícil valorar la respuesta inmune buscando anticuerpos circulantes en los embriones. Mark y Dixon (24) estudiaron la síntesis de anticuerpos en ratones neonatos usando proteínas solubles como estímulo antigénico. Demostraron que en ratones recién nacidos, las células transferidas del adulto singeneico desarrollan su función inmunológica aunque no en la misma magnitud que en el animal adulto. Makinodan y Peterson (25) estudiaron la capacidad para formar anticuerpos de células esplénicas provenientes de ratones de distintas edades, entre 1 semana y 29 meses, transferidas a receptores irradiados de 12 semanas de vida. Estas experiencias demostraron que existe una gran deficiencia funcional en las células linfoides provenientes de animales de una semana de vida ya que la cantidad de anticuerpos formados era aproximadamente el 1% de los niveles alcanzados en la etapa de la madurez inmunológica. La capacidad inmunológica de estas células se incrementó rápidamente entre la primera semana y el primer mes de vida y continuó aumentando hasta que los dadores tuvieron 8 meses de edad.

En otros trabajos Bosma y col. (26), utilizando ratones libres de gérmenes como dadores, demostraron que ni la flora microbiana normal ni la presencia de anticuerpos maternos son requisitos para el desarrollo normal de las células formadoras de

anticuerpos. Carter y Rector (27) estudiaron la respuesta a glóbulos rojos de carnero (antígeno timo dependiente) en ratones neonatos ya sea por estimulación directa o por ensayos de transferencia de células de bazo a receptores sigeneicos irradiados valorando la respuesta por cuantificación de las células formadoras de anticuerpos. Estos autores demostraron que las células de bazo provenientes de ratones de 1 a 3 días de vida solo respondieron cuando fueron transferidas junto con el antígeno en receptores irradiados, esta respuesta fue mayor cuando las células se transfirieron junto con células tímicas. Después del cuarto día obtuvieron respuesta positiva a partir de células de bazo directamente, momento que coincide con la invasión esplénica de linfocitos derivados del timo. La magnitud de la respuesta se incrementó mucho más después del décimo día simultáneamente a la maduración del sistema procesador del antígeno. Concluyeron que la respuesta de los ratones, durante las dos primeras semanas del nacimiento depende de tres factores: la maduración de linfocitos B sensibles al antígeno, maduración de linfocitos T y maduración del sistema procesador del antígeno. Los trabajos realizados por Tyan y col. (28) indican que las células formadoras de anticuerpos, en el ratón recién nacido tienen la capacidad genética de responder ya que las células "stem" provenientes de hígado de embriones de 10 días de

gestación son capaces de producir cantidades limitadas de γ -G_{2a} anti-GRC cuando se transfieren a adultos irradiados inmunizados con GRC. El hecho de que normalmente no se detecten anticuerpos hasta 3 semanas después del nacimiento sugeriría que su producción estaría activamente suprimida en el ratón recién nacido y en el neonato (29). Precisamente en el ratón se ha sugerido, para ciertos antígenos, la existencia durante los primeros días de vida de una verdadera interrelación entre células pertenecientes al circuito supresor de la respuesta de anticuerpos y otro sistema denominado por Green y Gershon contrasupresor (30 (31)). Del predominio de uno y otro mecanismo dependería en positivo o negativo la funcionalidad de las células. Como lo demuestran los trabajos de Sherwin y Rowlands (32), la adquisición de la capacidad de la respuesta inmune no es al azar sino que estaría determinada genéticamente, ya que existe una secuencial aparición de células B comprometidas, específicas para distintos antígenos, cuyo patrón de respuesta es semejante en ratones que comparten el locus H-2K. A pesar de que los ratones recién nacidos poseen la información genética para dar una respuesta humoral, la heterogeneidad de dicha respuesta sólo se alcanza entre los 7 y 10 días después del nacimiento (33). Rosenberg y Cunningham (34) midieron el momento de aparición de la respuesta inmune humoral transfiriendo células de hígado de

ratones de distintas edades a adultos irradiados. Encontraron que, a diferencia de las células de bazo maduras y competentes que tardan 4-5 días, en producir la respuesta, las provenientes de fetos de 15 días tardan 14 días y las de ratones recién nacidos 7 días.

También en el hombre se han realizado estudios similares a aquellos descritos en animales de experimentación. En ellos se demuestra que es posible inducir respuesta inmunológica en el recién nacido si se utiliza el antígeno correcto. Desde la década del 50 se conoce que niños recién nacidos pueden responder a antígenos como los toxoides tetánico y diftérico (35), vacuna anti-pertussis (36), virus de la poliomielitis (37) y otros, así como también son vulnerables a la infección por Herpes simple, citomegalovirus y ciertos Coxsackie. Sin embargo es interesante destacar que la intensidad de la respuesta no alcanza a la obtenida en el adulto, pero es suficiente como para proveerlos de cierto grado de inmunidad protectora. Los estudios minuciosos sobre la cronología de la maduración de la respuesta inmune en el hombre, han permitido la rigurosa elaboración de los planes de vacunación existentes.

Si bien el desarrollo inmune estaría determinado genéticamente no puede descartarse como uno de los factores responsables del estado final de maduración de la capacidad inmunológica,

la influencia que ejerce la estimulación antigénica del medio ambiente.

1.2.2. Desarrollo del tejido linfoide:

Se acepta que el sistema linfoide comprometido en la respuesta inmune está constituido por: 1) componentes centrales relacionados con la diferenciación de las células linfoides primitivas hasta su transformación en linfocitos capaces de reaccionar con el antígeno y 2) un compartimiento periférico cuyas células ya maduras pueden reaccionar inmunológicamente. El sistema linfoide central comprende a su vez: a) la médula ósea b) el timo y c) un constituyente cuya inmunidad solo se estableció con certeza en las aves(bursa de Fabricio) pero que en los mamíferos recibe el nombre de tejido equivalente a la bursa. El sistema linfoide periférico comprende: a) los ganglios linfáticos, b) el bazo y c) el tejido linfoide intestinal.

Los linfocitos provienen de la médula ósea (hígado fetal o saco vitelino) donde se originan por división de las células madres o "células stem". De allí migran a los órganos centrales donde maduran y adquieren nuevas características y funcionalidad que los convierte en linfocitos B o T expresando en sus membranas una serie de marcadores que los hacen fácilmente distinguibles entre sí.

Los linfocitos T maduran en el timo y los B en la bursa de Fabricio, en las aves. La naturaleza anatómica del equivalente de la bursa en los mamíferos todavía no está suficientemente definida y se encuentra en discusión. Una vez completada la etapa de maduración, los linfocitos migran hacia los órganos periféricos donde se alojan. La última etapa de la maduración y la verdadera activación de las células se cumplen a partir del contacto con un antígeno y/o por alguna otra señal estimuladora. Cuando así sucede, el linfocito B se transforma en una célula plasmática productora de anticuerpos y el linfocito T evoluciona hacia alguna de las funcionalidades conocidas, ayudador, efector, citotóxico o regulador.

Después del descubrimiento, hace aproximadamente 10 años de células linfoides no T y no B denominadas según su funcionalidad, destructoras naturales (NK) y supresoras naturales (NS), muchos adelantos se han hecho en cuanto a su modo de acción, pero su linaje hematopoyético aún no ha sido estudiado profundamente así como también su aparición ontogenética.

El desarrollo ontogénico de los órganos linfoides, ha sido objeto de numerosas investigaciones.

En todos los animales en los cuales se han realizado estudios comparativos, el timo es el primer órgano que se desarrolla como un verdadero tejido linfoide. En el pollo comienza

a evidenciarse el componente epitelial ya en el octavo día de gestación y aproximadamente al 10° día se observan estructuras lobulillares pero no se distingue médula de corteza y tres días más tarde adquiere su desarrollo completo como órgano linfoide (38). Existen 3 períodos de migración de células precursoras hacia el timo, durante el 6to , 11ro y 17mo días de gestación (39) . Estas células penetran simultáneamente en la médula y en la corteza, distribuyéndose uniformemente en el tejido tímico. Mas tarde ya se ubican en la médula y debajo de la cápsula tímica. La bursa de Fabricio comienza a esbozarse a partir del mesénquima al 7° día de gestación pero recién hacia el día 18 presenta una estructura linfoide bien organizada (40).

El desarrollo bursal es máximo entre las 3 y 6 semanas de vida para comenzar luego a involucionar hasta la semana 16 (41) En el momento de la eclosión solo el timo y la bursa se diferencian como tejido linfoide. En el ratón el timo desarrolla actividad linfopoyética a partir del día 14 de gestación ya que hasta ese momento consistía en una condensación de tejido mesenquimatoso (42). Los nódulos linfáticos y el bazo así como también el tejido linfoide intestinal no presentan una estructura linfoide bien organizada hasta después del nacimiento. Esto mismo sucede en otras especies de mamíferos como la rata, el

hamster y el conejo (43).

1.2.2.1. Maduración de los linfocitos B

Trabajos realizados en pollos han demostrado que las primeras células portadoras de inmunoglobulinas intracitoplasmáticas (IgM_C) aparecen en la bursa hacia el día 12 de gestación. Esta inmunoglobulina tiene en ese momento una localización difusa; hacia el día 16 se localiza fundamentalmente alrededor del núcleo y luego de la eclosión se la observa formando vesículas citoplasmáticas (44).

A diferencia de lo que sucede en los mamíferos, no existe en el pollo, un período prolongado de síntesis de cadenas intracitoplasmáticas (45). La secreción de IgM comienza el día 18 de gestación (44).

En otros tejidos como el bazo, las células portadoras de inmunoglobulinas aparecen más tarde que en la bursa (41). En el bazo durante los 10 primeros días de gestación no es posible observar células que puedan ser clasificadas como linfoides. En el día 11, se encuentran células grandes, medias y pequeñas pero la actividad linfopoyética de este órgano es baja hasta el día 16 (38).

La bursectomía realizada alrededor del día 17 de gestación conduce a una profunda deficiencia inmune generalizada. Sin embargo aún realizada en estadíos más tempranos del

desarrollo es posible encontrar algunos vestigios de inmunidad humoral (47), lo que sugeriría la posible existencia de otros tejidos , en estos animales, en los cuales podría ocurrir también la maduración de los linfocitos B.

En los mamíferos la formación de linfocitos B no se restringe a un simple tejido (48). Se habló de varios sitios posibles, incluyendo la misma médula ósea, tejidos linfoides intestinales y el hígado fetal.

La más temprana detección de linfocitos B es en órganos hematopoyéticos tales como el hígado y el bazo fetales. El desarrollo de células B a partir de células derivadas del saco vitelino no ha sido estudiada suficientemente. Los principales adelantos respecto a la maduración de linfocitos B en mamíferos fueron obtenidos utilizando el ratón como modelo experimental. Owen y col (49) en estudios realizados con explantes de hígado y bazo fetales murinos, han demostrado que células carentes de inmunoglobulinas de superficie (Ig_s^-) generaron células B IgM_s^+ . Estos autores, en trabajos posteriores, demostraron también que la médula ósea fetal es un importante sitio de producción de células B que continúa aún en la edad adulta, mientras que el hígado y el bazo declinan en su función después del nacimiento (50).

Abney y col (51) propusieron un esquema en la maduración de los linfocitos B del ratón basados en la expresión secuencial de

inmunoglobulinas. La célula denominada Pre-B que es IgM_c^+ aparecería en el hígado fetal a los 12 días de gestación. Estas células alrededor del día 17 darían origen a linfocitos B inmaduros que se caracterizan por poseer IgM en su superficie, carecen del marcador Ia codificado por el complejo mayor de histocompatibilidad $\text{H}_2(\text{Ia}^-)$ (IgM_s^+) y ser estimulables por mitógenos como el LPS.

En el momento del nacimiento se encuentran en hígado y en el bazo del ratón células B que presentan en su superficie IgM acompañada ya sea por alguna de las subclases de IgG o IgA. Después de 7 días se detecta además IgD en células de bazo y nódulo linfático. El cambio o "switch" de inmunoglobulinas de superficie puede ocurrir in vitro en ausencia de linfocitos T ayudadores en células con o sin IgDs (52). Las células B portadoras del marcador genético Ia (Ia^+) son pocas en número y poseen baja densidad de este antígeno en los ratones recién nacidos; su expresión completa se produce algunas semanas después del nacimiento (53). El antígeno Q_a-2 también codificado por el H_2 se encuentra solamente en células precursoras de la médula ósea del adulto y no en tejidos fetales. Su expresión se completa 4 semanas después del nacimiento. Algo similar ocurre con el antígeno de la serie Ly, Lyb-2, el cuál no se detecta en células fetales precursoras del linfocito B. Aunque se han detectado células $\text{Ig}^- \text{Fc}^+$

en hígado fetal (54) los niveles de esta célula no alcanzan los hallados en el bazo del animal adulto hasta 4-6 semanas de edad. El receptor C_3 aparece tardíamente en la ontogenia y es apenas detectado antes de las 2 semanas. Los niveles del animal adulto se alcanzan entre las 2 y 4 semanas de edad. Por lo tanto, la formación de células B en tejidos fetales tiene lugar a través de procesos diferentes a los que ocurren en la vida adulta. Esto ha sido confirmado recientemente por Landreth y col, (55) utilizando un anticuerpo monoclonal dirigido hacia antígeno 14.3 presente en células B y en sus precursoras. Así pudieron obtener una suspensión enriquecida de células precursoras y de linfocitos B y compararon la linfopoiesis del animal adulto y del embrión. Comprobaron que las células precursoras provenientes del hígado fetal de 16 días que son $14-8^+ \text{ Igs}^- \mu_c^+$ abarcan solo el 1% de las células totales y son grandes y con núcleos lobulados. A los 19 días ya ocupan el 30% y han disminuido de tamaño semejándose a las células precursoras del animal adulto las que se encuentran ocupando el 50%.

1.2.2.2. Maduración de linfocitos T

En los últimos 10 años el empleo de sueros específicos dirigidos hacia los determinantes antigénicos de membrana Thy-1, TL, y de la serie Lyt ha permitido estudiar la ontogenia del

linfocito T y diferenciar sus distintas subpoblaciones.

Owen y Ritter (56) utilizando técnicas de citotoxicidad e inmunofluorescencia demostraron que las células "stem" migran hacia el epitelio tímico alrededor del día 11 de gestación y ya en el día 13 es posible identificar células Thy-1^+ . Tyan (57) demostró que estas células "stem" provienen principalmente del hígado fetal y ya están presentes antes de la aparición del timo. A partir del día 14 hay una proliferación celular exponencial y se detectan linfocitos portadores en su superficie de antígeno de la serie Ly en timo y ya en el día 19 están expresados en niveles semejantes a los del ratón adulto, mientras que los niveles de TL son mayores y los de los antígenos codificado por el H-2 son menores (58). En el período intratímico los determinantes antigénicos de membrana Ly 1, 2, 3 se expresan simultáneamente en los timocitos. A los 7 días de vida los linfocitos $\text{Ly1}^+, 2^+, 3^+$ pueden ser detectados en bazo. Estos linfocitos inmaduros $\text{Ly1}^+ 2^+ 3^+$ pierden algunos de sus antígenos y conservan otros conformando distintas subpoblaciones linfocitarias ligadas a diferente funcionalidad (59).

Olson y col. (60) estudiaron el desarrollo postnatal de células T Qa-4^+ ó Qa-5^+ , antígenos que están expresados sobre linfocitos periféricos. Comienzan a detectarse en bajos niveles en el momento del nacimiento, incrementándose hasta alcanzar

la concentración del animal adulto entre 4 y 6 semanas.

1.2.3. Desarrollo ontogenético de la respuesta inmune mediada por células.

Luego del nacimiento de la inmunología a fines del siglo pasado y de delimitar su complejidad se desarrollaron una serie de trabajos experimentales destinados a estudiar la respuesta inmune. En la década de 1920, Freund (61) (62) estudió detalladamente la reacción del cobayo, sensibilizado con bacilo tuberculoso muerto, a la inyección intradérmica de tuberculina descrita casi 40 años antes por Koch (63). Demostró que esta reacción era negativa o muy pobre en animales de menos de un mes de edad en comparación con la del cobayo adulto. Sin embargo se sensibilizaban cuando recibían una inyección intraperitoneal de tuberculina de la misma manera que los cobayos adultos tuberculosos. Estos resultados fueron también corroborados por Salvin y col (64). Es evidente entonces que la deficiencia del cobayo recién nacido no atañe el mecanismo de sensibilización sino a las características anatómicas y fisiológicas de la piel del animal joven. Trabajos posteriores realizados y en otras especies inclusive en el hombre demostraron resultados similares (65) (66).

Estudiando la ontogenia del rechazo de injerto de piel, las experiencias indicaron que la capacidad del rechazo se adquiere más precozmente que la mayoría de los fenómenos inmunológicos,

y, dependiendo de la especie animal puede ocurrir antes del nacimiento (67) (68) o después (69). Cohen y col. (70) demostraron que el timo del ratón recién nacido es inmunológicamente reactivo contra antígenos de transplante. Goldstein y col (71) ensayaron la reacción "injerto contra huésped" en adultos irradiados que habían sido transferidos con célula de timo o bazo provenientes de ratones no natos desde los 19 días de gestación. Estas experiencias apoyaron los resultados de Cohen y demostraron que las células T esplénicas adquieren cierto grado de competencia inmunológica, para determinados antígenos entre el 3ro y 4to día post-natal que incrementa con la edad (72) alcanzando los niveles máximos a los 30-60 días de vida (73).

Papiernik y col. (74) sugirieron que la maduración se realiza bajo control humoral tímico. Los timocitos de ratones neonatales también son capaces de responder "in vitro" a células aloisogénicas (75) y a mitógenos (PHA y Con A), aunque los niveles del adulto no se adquieren hasta las 3 semanas de vida (76).

Chiscon y Golub (77) examinando la maduración de las células T en términos de su habilidad para colaborar como "ayudadoras" en la producción de anticuerpos anti-glóbulos rojos de carnero demostraron que ésta se adquiere a las 48 hs. después del nacimiento pero alcanza niveles del adulto entre los 8 y 10 días aunque la respuesta a antígenos T dependientes es detectable

después de la primera semana de vida. Raybourne y col (29) propusieron que la carencia de respuesta en los primeros tiempos post-nacimiento se debería a la presencia, en los ratoens recién nacidos, de células supresoras inespecíficas. Estudios posteriores realizados por Muraoka y Miller (78) caracterizaron fenotípicamente esta población celular demostrando que son células Thy-1⁻ Igs⁻, resistentes a la radiación, que se detectan en el hígado fetal a los 13 días de gestación. En el momento del nacimiento, el 80% de las células mononucleares de bazo portan este fenotipo mientras que a los 30 días de vida el porcentaje se reduce al 20% (79).

1.2.4. Tolerancia inmunológica y maduración

Un camino adicional para estudiar la ontogenia de la inmunidad es considerarla en términos de la susceptibilidad para la producción de tolerancia inmunológica. Este fenómeno tuvo su origen en las observaciones de Owen en 1945 (80) de que terneros gemelos univitelinos presentaban en circulación, sin alteración alguna, dos grupos sanguíneos diferentes. Su interpretación fue que los gemelos habían intercambiado precursores celulares sanguíneos durante la vida fetal aceptándolos como injertos funcionales. Ambos aceptaban mutuamente injertos de piel aunque rechazaban los de sus padres o de hermanos de diferente camada.

La susceptibilidad para la inducción de tolerancia varía de especie a especie, de cepa a cepa, de la naturaleza y dosis de antígeno así como también de la ruta de administración. En determinadas condiciones puede ser producida en la edad adulta como lo demuestran los trabajos de Dresser (81), pero la facilidad de inducir un estado de tolerancia está inversamente relacionada al desarrollo del tejido linfoide. La mayor facilidad para la producción de tolerancia corresponde al período embrionario y neonatal y su duración es variable dependiendo de la especie y naturaleza del estímulo. Se ha sugerido que la tolerancia a lo propio se genera durante este período crítico. Friedman (82) propuso que la intensidad y duración de la carencia de respuesta está relacionada a la concentración del antígeno en las células linfoides. Demostró que la transferencia de células de bazo de ratones normales a neonatos inoculados con una dosis tolerizante de Shigella paradysenteriae impide el establecimiento de la no respuesta debido al incremento en el número de células disponibles para el antígeno. Los trabajos de Neeper (83) parecen indicar que la inducción de tolerancia en el adulto resulta de la destrucción de células inmunológicamente competentes. Estos resultados se interpretaron en favor de la teoría de la tolerancia inmunológica por aborto clonal (84). La diferencia esencial entre ratones maduros y recién nacidos por lo tanto,

estaría en el número relativo de células inmunológicamente competentes disponibles.

Cuando se desarrolla un estado de tolerancia pueden comprometerse linfocitos T o B o ambos, aunque las células T son más fácilmente inducibles que las B. Por otra parte Nossal y Pike (85) demostraron que los linfocitos B de animales inmaduros son más fácilmente inducibles que los provenientes de animales maduros. Los trabajos realizados por Venkataraman y Scott (86) tratando de explicar los mecanismos de la tolerancia en la edad adulta y neonatal, demuestran que en estos últimos existe una eliminación clonal de células específicas para ese antígeno cuando son inoculados con dosis tolerigénicas.

Todas estas teorías han sido objetadas frente a la evidencia surgida de recientes estudios que indican la presencia de mecanismos supresores activos en la inducción de la tolerancia neonatal. Ya han sido muy bien descritos en el ratón adulto circuitos supresores específicos que regulan negativamente la respuesta hacia varios antígenos principalmente haptenos a través de factores producidos por las distintas subpoblaciones de células T supresoras interactuantes (87). Okada y Strober (88) demostraron la presencia de células T supresoras inespecíficas en la médula ósea de ratones recién nacidos las cuales activarían la formación de células T supresoras específicas y responsables

de la supresión de la actividad T citolítica. Estas interacciones reguladoras explicarían la facilidad de inducción de tolerancia " in vivo" en el recién nacido.

Otros investigadores han propuesto la existencia de factores séricos supresores en los animales recién nacidos. En este aspecto Gershwin y col (89) estudiaron el efecto de la α -fetoproteína, una proteína sérica presente en alta concentración en el suero de ratones recién nacidos y de embriones y en baja concentración en los animales adultos.

Estos autores demostraron que produciría la generación de células T supresoras esplénicas sensibles a la cortisona. También se encontró que la α -fetoproteína actuaría sobre monocitos activadores de linfocitos T supresores (90). No se puede dejar de lado los trabajos de Green y Gershon ya mencionados (30) (31) los cuales ponen en evidencia la existencia, en el ratón adulto de células T contra-supresoras. La falta de capacidad funcional en estas células en el recién nacido podría ser otro mecanismo que explicaría también la facilidad de inducción de tolerancia en estos animales.

Son muchos los mecanismos que pueden explicar las diferentes susceptibilidades a la inducción de tolerancia en animales adultos y neonatos. Es probable que más de uno esté involucrado en el desarrollo del estado de tolerancia lo que dificulta el

estudio de cada uno de los sistemas. En la actualidad son muchos los grupos de trabajo que están tratando de profundizar en este tema.

1.2.5. Inmunobiología de la relación materno-fetal:

Una de las paradojas inmunológicas más difíciles de explicar es que los fetos de los mamíferos que presentan un set inmunológico de antígenos del padre, extraños a la madre, sobrevivan al período de gestación intrauterino sin rechazo, aunque la madre sea capaz de rechazar injertos provenientes del padre. Medawar (91) en 1954 tratando de explicar esta paradoja formuló una serie de hipótesis:

- el feto no es inmunogénico y por lo tanto no induce una respuesta inmunológica materna.
- la preñez altera la respuesta inmunológica materna.
- el útero es un sitio privilegiado inmunológicamente.
- el feto no es aún inmunológicamente competente.

Estas hipótesis han originado el análisis crítico de los investigadores para llegar a un entendimiento de este fenómeno tan complejo.

Una vez que se ha producido la fecundación, el blastocito migra protegido por las secreciones mucoides hasta su implantación. En el ratón existen evidencias que el blastocito es

inmunogénico ya antes de su implantación (92) y se ha comprobado que existen inmunoglobulinas maternas que se unen al blastocito (93) cuyo papel biológico no está claramente definido.

Los resultados obtenidos acerca de la inmunogenicidad del trofoblasto son contradictorios. En la placenta se ha comprobado la existencia de antígenos específicos capaces de originar una respuesta inmune responsable de abortos espontáneos (94).

Los antígenos de histocompatibilidad aparecen en las células internas del embrión de ratón a las 96 hs. post fecundación (92). En otras especies también se han detectado antígenos fetales durante el período de gestación que provocan en la madre el desarrollo de anticuerpos como los bien conocidos anti-Rh, anti-HLA en el hombre cuyos títulos incrementan con los sucesivos embarazos. Se ha descrito una IgG (95) dirigida contra antígenos HLA-D, los cuales están involucrados en el inicio de la sensibilización de linfocitos efectores, hecho que contribuiría a la supervivencia del feto actuando como anticuerpos bloqueantes.

Una serie de trabajos han demostrado que las células maternas están claramente sensibilizadas hacia antígenos paternos, ¿porqué el feto no es entonces rechazado inmunológicamente por la madre ?. Muchas teorías se han elaborado al respecto.

El útero podría ser considerado un sitio inmunológicamente privilegiado debido al escaso drenaje de linfocitos lo que

explicaría por qué, el feto, no es rechazado dentro del útero como cuando se implanta en otros tejidos (96). Sin embargo es posible inducir respuestas inmunes locales en el útero de algunos animales de laboratorio. Beer (97) ha sugerido que en el embarazo, los linfáticos que drenan el útero podrían generar células T supresoras o anticuerpos bloqueadores. Algunos autores han propuesto que las hormonas, cuya concentración aumenta en el período gestional, tienen efectos inmunosupresores, sería el caso de los estrógenos (98) y de la progesterona (99). Altas dosis de estas hormonas también son capaces de inhibir la respuesta inmune humoral (100). Glicoproteínas asociadas a la preñez, como α_2 -macroglobulina, β_1 -glicoproteína, y α -fetoproteína que es un componente normal del fluido amniótico y del suero fetal en muchas especies (101), tienen también efecto supresor sobre la respuesta inmune (102).

Kaliss y Dagg (103) sugirieron que ciertos anticuerpos humorales presentes en el suero materno dirigidos específicamente hacia antígenos fetales, al bloquear sus determinantes antigénicos, facilitarían el crecimiento celular. En ausencia de esos anticuerpos las células fetales serían rechazadas.

Los trabajos realizados por Wegmann y col. (104) demuestran que la placenta actúa como una barrera inmunoadsorbente específica e inespecífica para anticuerpos dirigidos contra los

antígenos de histocompatibilidad paternos presentes en el feto. Wegmann (105) utilizando anticuerpos monoclonales específicos para antígenos paternos consiguió la unión a la placenta de estos anticuerpos, no solo a través del fragmento F_c sino también utilizando el fragmento $F(ab')_2$. Es debido a este secuestro placentar el hecho de que no se encuentren anticuerpos citotóxicos dirigidos contra antígenos fetales en la sangre neonatal (106).

El suero normal de mujeres multíparas inhibe la proliferación en las reacciones de MLR (Mixed Lymphocyte Reaction) entre linfocitos de origen materno y paterno y también la producción de MIF (factor inhibidor de la migración de los macrófagos) a través de "un factor" caracterizado como IgG (107). Estos anticuerpos son citotóxicos para células B y han sido eluidos de la placenta humana (108). Chaouat y Voisin (109) describieron también en hembras multíparas la presencia de células T supresoras que inhiben la MLR entre células maternas y paternas. Recientemente se ha demostrado que células trofoblásticas o algunos de sus productos tienen efecto inhibidor sobre varios tipos de células citotóxicas que son potencialmente, para el feto, peligrosas (110).

Se puede concluir, a partir de todos estos resultados, que serían varios los mecanismos que asegurarían la supervivencia

del feto en el útero materno.

Un aspecto muy importante a considerar en esta interrelación es la transferencia pasiva de anticuerpos de la madre al feto. En todas las especies de aves y mamíferos estudiadas, hay mecanismos provistos por la naturaleza que aseguran la transferencia de proteínas inmunológicamente activas de la madre al recién nacido. Los primates incluyendo al hombre, difieren de las otras especies en que la transferencia de las γ -globulinas se produce a través de la placenta mientras que en el conejo, cobayo y rata tienen lugar también a través del saco vitelino (111). En el pollo se realiza vía el epitelio folicular del embrión de 4-5 días de vida y a través del saco vitelino en el embrión tardío (112). En el porcino y bovino, no ha podido evidenciarse la transferencia de γ -globulina al feto. La transmisión más importante, en estos animales, se realiza a través del calostro. En roedores la leche materna es también una vía significativamente importante de transferencia pasiva de inmunidad al feto. Por lo tanto, cuanto menos número de capas tenga la placenta mayor importancia cobra la vía transplacentaria en la transferencia de inmunidad.

Muchos grupos de trabajo han concluido que las inmunoglobulinas que tienen la capacidad de ser transmitidas al feto pertenecen a la clase IgG. El mecanismo por el cuál esta inmunoglobulina

bulina atraviesa los tejidos fetales consta de dos pasos: 1) reconocimiento por receptores presentes en su membrana y posterior unión a ella 2) translocación activa. Estudios realizados en conejos han demostrado que la IgG se une a través de la región CH_2 de su fragmento F_c a receptores específicos presentes sobre la superficie celular endodérmica del saco vitelino y luego por endocitosis, seguida por transporte a través de la célula, es liberada a los vasos sanguíneos del mesodermo vascularizado (113). Por otra parte la placenta actúa como una barrera selectiva al tráfico celular entre la madre y el feto (114).

La principal inmunoglobulina presente en el calostro de muchas especies estudiadas es la IgA (115) (116) (117) la cuál es sintetizada por células plasmáticas locales cuyos precursores se originan en el tejido linfoide asociado al intestino (118). En el calostro hay un componente celular que en el hombre es tá constituido en su mayoría por macrófagos, leucocitos polimorfonucleares y aproximadamente 10% de linfocitos T y B cuyo papel biológico no se conoce con exactitud. Aparentemente los linfocitos T pertenecen a un subset seleccionado y diferente de los encontrados en sangre periférica (119). No son concluyentes los resultados obtenidos acerca de si estos linfocitos pasan o no por el epitelio intestinal del recién nacido y ejercen en él al

guna función inmunológica.

Las inmunoglobulinas llegan a la circulación del feto y del recién nacido a través de las células endodérmicas intestinales por proceso de pinocitosis (120).

En las ratas lactantes, se ha encontrado IgA proveniente de la leche materna en el primer tercio proximal del intestino delgado y aparentemente sus sitios de unión a la membrana de las células intestinales difieren de los sitios en los cuales se une la IgG (123).

2. OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO

Algunas de las preguntas básicas de la inmunología pueden llegar a responderse con un estudio detallado del desarrollo de la inmunidad en términos ontogenéticos. La rata es uno de los animales más empleados en los trabajos experimentales y sin embargo, a diferencia del ratón, no es posible encontrar en la bibliografía suficientes datos que permitan un conocimiento adecuado de la evolución ontogenética de su maduración inmunológica.

Como se trató en la sección anterior son muchos los aspectos relacionados con este tema.

Un estudio profundo que abarque el amplio espectro de interrelaciones celulares, adquisición de la capacidad de producir una respuesta tanto humoral, como celular, a distintos antígenos, posibilidad de inducir un estado de tolerancia, maduración de todos los elementos que intervienen en una respuesta inmune, habilidad para iniciar o expresar respuestas alérgicas, conocimiento de la relación materno fetal tanto en lo que se refiere a transferencia pasiva de anticuerpos por tejidos fetales y/o por leche como determinar la influencia de dicha transferencia en la capacidad de los neonatos de desarrollar una respuesta activa, utilizando como modelo la rata, es un trabajo ar-

duo y muy extenso. El objeto de esta tesis fue tomar algunos aspectos de estos problemas, iniciar su estudio detallado y con ello obtener bases de comprensión mínima que sin duda podrán ser ampliados empleando técnicas y metodología más precisas, que el acelerado avance de la inmunología nos provee. Estudios desarrollados en esta tesis comprenden:

2.1. Estudio de las proteínas séricas

Un completo conocimiento de la química, fisico química y propiedades immunoquímicas de las proteínas del suero son un prerequisite para lograr el entendimiento de sus procesos patológicos y fisiológicos.

El análisis de las proteínas séricas normales en las ratas será un estudio previo para comprender las eventuales modificaciones relacionadas con la edad con especial referencia a las inmunoglobulinas.

2.2. Maduración de la respuesta inmune humoral

En el estadio embrionario y en el período neonatal, los animales son deficientes inmunológicamente. Sin embargo, se ha demostrado que utilizando determinados antígenos es posible en algunas especies inducir la producción de anticuerpos activamente. En este trabajo se emplearon diversos antígenos con características diferentes para determinar con cada uno de ellos

la edad en la cual la rata adquiere la capacidad de desarrollar una respuesta inmune humoral. Se conoce en esta respuesta la participación de las células T ayudadoras en la formación de anticuerpos dirigidos hacia glóbulos rojos de carnero (GRC) y hacia Albúmina Sérica Bovina (ASB), antígenos que se clasifican en este caso como Timo-dependientes. Uno de ellos particulado y por ende con mayor antigenicidad y otro soluble. La respuesta hacia estos antígenos depende además de la participación de células auxiliares como por ejemplo los macrófagos. Por el contrario, la respuesta hacia otro grupo de sustancias antigénicas clasificadas como Timo-independientes, depende sólo de la actividad de las células B. En este trabajo se empleó un lipopolisacárido componente de la pared celular de Escherichia coli como antígeno Timo-independiente.

2.3. Inducción de tolerancia:

Es bien conocida la mayor facilidad en el desarrollo de un estado de tolerancia ligada a la inmadurez del sistema linfóide. Uno de los objetivos de este trabajo fue comenzar el estudio de la posibilidad de desarrollarla en la rata neonatal y las posibles modificaciones que pueden surgir en la respuesta al variar las dosis y las vías de administración del antígeno empleado.

2.4. Desarrollo de la capacidad de iniciar y/o expresar reacciones de hipersensibilidad.

Son muchos los elementos que participan en este tipo de reacciones. Un conocimiento profundo de la capacidad de iniciarlas y/o expresarlas implica entre otras cosas el estudio de la maduración de la rata para desarrollar anticuerpos específicos al antígeno, la distribución y maduración de elementos celulares que intervienen, el nivel de complemento sérico disponible y su variación según la edad de los animales, y por último la integridad de los componentes de la piel que permitan expresar la reacción cutánea. En este trabajo se encararon casi todos estos aspectos para poder determinar en qué momento, la rata es capaz inmunológicamente de expresar una reacción positiva y con los resultados obtenidos se sugieren las posibles causas de incapacidad.

2.5. Maduración de la respuesta inmune celular:

Un ejemplo típico de respuesta de base celular es la llamada hipersensibilidad de contacto cuya iniciación depende de la sensibilización de linfocitos T, y su expresión de la capacidad de estas células de desencadenar los mecanismos que conducen a la reacción.

Para este estudio se empleó una sustancia hapténica am-

pliamente utilizada como es el 2,4-Dinitro-1-fluorbenceno(DNFB). El DNFB es una sustancia química que unida a las proteínas dérmicas ("carrier") es capaz de sensibilizar el organismo.

2.6. Estudio de la diferenciación celular:

La capacidad de un organismo de responder a un antígeno determinado depende, entre otros factores, de la interacción de distintos tipos celulares que se diferencian por caminos separados. Uno de ellos mediado por el pasaje por el timo(linfocitos T) y el otro por la bursa de Fabricius en las aves o su equivalente en los mamíferos (linfocitos B). Ambas clases de linfocitos pueden ser identificados por marcadores antigénicos característicos presentes en la membrana celular que se adquieren durante el proceso de maduración. La cuantificación, distribución y maduración de estos tipos celulares son conocimientos necesarios para comprender los procesos que controlan la aparición de la competencia inmunológica.

2.7. Relación Materno-fetal: Inmunidad pasiva natural

La transmisión de anticuerpos de la madre al feto tiene importancia desde el punto de vista ontogenético fundamentalmente por dos aspectos:

- 1) Los anticuerpos proveen protección inmunológica pasiva al recién nacido y esta protección inmune tiene lugar hasta que

los animales adquieren su propia competencia y responden en forma activa a una estimulación antigénica.

2) La presencia de anticuerpos específicos derivados de la madre influye sobre el desarrollo de la respuesta inmunológica activa en los animales jóvenes.

El objetivo de esta investigación fue estudiar la transferencia de anticuerpos de ratas inmunizadas al feto y al animal lactante ya sea por tejidos fetales y/o leche, para determinar la importancia de cada una de estas vías en la inmunidad pasiva natural.

Las pautas experimentales a seguir en el estudio de cada uno de los aspectos mencionados fueron determinadas primeramente en el animal adulto con el fin de utilizarlo como parámetro de comparación, en las experiencias diseñadas con ratas lactantes. Se consideró que un animal de tres meses de vida no solo es inmunológicamente maduro sino que es ese período el de actividad máxima desde el punto de vista inmunológico ya que está comprobado que el sistema linfoide de la rata a partir de los cuatro meses de vida comienza su involución (124).

Con la edad, el timo va disminuyendo de tamaño y peso

mientras que el bazo lo va aumentando pero ambos disminuyen en igual medida su número de células por gramo de peso. Esto implica, por lo tanto, una declinación a partir de ese momento de la reactividad inmunológica.

Las primeras experiencias fueron realizadas en ratas de la cepa Wistar de exocría que era mantenida y reproducida en los bioterios de la Cátedra de Microbiología, Parasitología e Inmunología de la Facultad de Medicina, UBA. Posteriormente al ser adquirida comercialmente a Simonsen Lab, Inc; Gilroy, USA, la cepa endocriada Buffalo/Sim la mayoría de los trabajos se realizaron en esta cepa genéticamente pura. Es bien sabido que una línea de estas características presenta un 98-99% de homocigosis y por lo tanto la reproducibilidad y homogeneidad de los resultados es altamente superior. Por esta razón, algunos de los aspectos de este trabajo fueron estudiados empleando esta cepa, principalmente aquellos en los cuales se debía realizar transferencia singeneica de células.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. ANIMALES

3.1.1. Ratas

Se utilizaron para las experiencias dos cepas de animales: Wistar, de exocría y Buffalo/Sim (Simonsen Lab, Inc; Gilroy, USA), de endocría, mantenidas y reproducidas en el bioterio de la Cátedra de Microbiología, Parasitología e Inmunología, de la Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. Los animales se mantuvieron alojados en cajas plásticas o de acero inoxidable hasta el momento del destete y luego fueron transferidos a jaulas especialmente diseñadas para tal fin en grupos de diez animales como máximo. Las hembras preñadas se controlaron dos veces por día para consignar con exactitud la fecha de parición. Todos los animales fueron alimentados con Purina, alimento balanceado comercial y agua "ad libitum".

3.1.2. Conejos

Blancos de alrededor de 3 Kgs de peso, de origen comercial.

3.1.3. Carnero

Raza criolla de 12 a 18 meses de edad, fue donado por el INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria). Los gló-

bulos rojos de carnero (GRC) utilizados a lo largo de todas las experiencias procedieron del mismo animal.

3.1.4. Cabra

De 12 a 18 meses de edad, de origen comercial.

3.2. ANTIGENOS (Ag) Y DISEÑO EXPERIMENTAL

3.2.1. Particulados

3.2.1.1. Glóbulos Rojos de Carnero

Fueron obtenidos a partir de la vena yugular del carnero, colocados inmediatamente en Solución Alsever y almacenados a 4°C. Se usaron en todos los casos, dentro de los 30 días de su extracción. Previo a su empleo en los distintos experimentos, fueron lavados tres veces con Solución Fisiológica (SF), contados en una cámara de Neubauer y diluïdos a la concentración deseada.

Este Ag fue utilizado en ratas Buffalo/Sim en una serie de experiencias para estudiar el desarrollo de la capacidad de los animales de formar anticuerpos (Ac). Se investigó la respuesta sérica y se cuantificaron las células formadoras de Ac (CFA). Además, se determinó la respuesta primaria y secundaria. Estas experiencias fueron desarrolladas en ratas adultas y de diferentes edades con diseños experimentales que se detallan a continuación:

I) Ratas de 3 meses de vida, consideradas adultas, se emplearon como patrón a lo largo de las experiencias del trabajo. Por lo tanto todos los valores obtenidos con animales de diferentes edades fueron comparados con los encontrados en la rata de 3 meses de vida. Los animales se inocularon con 10^9 GRC, un lote por vía sub-cutánea (sc) en la almohadilla plantar y otro lote, por vía intraperitoneal (ip). La respuesta humoral fue valorada por hemaglutinación directa a partir de sueros obtenidos los días 4, 8, 14, 18, 22, 28, 35 y 42 post-inoculación (pi).

II) Ratas de distintas edades fueron inoculadas con 10^9 GRC por vía ip o por vía sc en la región cervical. La respuesta humoral fue valorada por hemaglutinación directa los días 7 y 14 pi.

III) Para determinar si la carencia de respuesta observada en las ratas inoculadas durante los primeros días de vida siguiendo el esquema anterior se debía a una inmadurez del aparato inmunocompetente o si se creaba un estado de tolerancia se probó en ratas de 2 días de vida el siguiente esquema:

Días de vida	0	2	9	16	23	30	GRUPO
Ag		GRC		GRC			<u>EXPERIMENTAL</u>
Días pi			+7 (1ra)	+14 (1ra)	+7 (2da)	+14 (2da)	
			S	S	S	S	

S: sangrado para valoración de Ac.

<u>16</u>	<u>23</u>	<u>30</u>	<u>GRUPO</u>
GRC			<u>CONTROL</u>
	+7	+14	
	S	S	

Como surge del esquema presentado, los animales recibieron dos inoculaciones del antígeno a los 2 y 16 días de vida. Se emplearon como dosis inmunizantes 10^9 , 10^7 o 10^5 GRC por vía ip o 10^9 GRC por vía sc. La respuesta humoral fue valorada por hemaglutinación directa los días 7 y 14 luego de cada inoculación. Grupos de animales que recibieron una única inoculación a los 16 días de vida sirvieron como control.

En todos los tiempos que se detallan en los esquemas I, II y III, los animales se sangraron ya sea por decapitación o por punción cardíaca según la edad. Se emplearon tres a cinco ratas por tiempo y los sueros fueron titulados individualmente.

IV) Ratas adultas y de 2 días de vida fueron inoculadas con 10^9 GRC por vía ip. Los días 5, 7, 11, 14, 18 y 21 pi se sacrificaron cuatro animales de cada grupo por tiempo para valorar la formación de Ac por cuantificación de las células esplénicas formadoras de Ac (CFA) según la técnica descripta en el punto 3.3.1.2.

V) Ratas de 2 días de vida recibieron una primera dosis de 10^9 GRC por vía ip y 14 días más tarde se les administró una segunda inoculación con la misma dosis y por la misma vía. Otro gru-

po de la misma edad (16 días de vida) que no había recibido la primera inoculación de antígeno sirvió de control. Las CFA fueron valoradas antes de la segunda inoculación y a los 5 y 7 días después de la segunda, utilizando cuatro animales de cada grupo por tiempo.

Días de vida	0	2	16	21	23	
						<u>GRUPO</u>
Ag	GRC		GRC			<u>EXPERIMENTAL</u>
Días pi			+14 (1ra)	+5 (2da)	+7 (2da)	
			<u>CFA</u>	<u>CFA</u>	<u>CFA</u>	
			16	21	23	<u>GRUPO</u>
						<u>CONTROL</u>
			GRC			
				+5	+7	
				<u>CFA</u>	<u>CFA</u>	

3.2.2. Solubles

3.2.2.1. Albúmina Sérica Bovina (ASB)

(SIGMA, Chemical Company, St. Louis, Mo.) Fracción V en polvo. Para obtener la concentración deseada fue diluída con buffer fosfato salino (PBS).

Se llevaron a cabo dos grupos de experiencias:

VI) Con el objeto de determinar la dosis de ASB a utilizar en el estudio de la maduración inmunológica de la rata hacia este

Ag se emplearon dos lotes de ratas Wistar adultas de 3 meses de vida las que se inocularon por vía sc en la almohadilla plantar con 5.000 μ grs y 500 μ grs respectivamente de ASB emulsificada en Adyuvante Completo de Freund (ACF) (128). Los animales fueron sangrados por la vena de la cola los días 12, 19, 26, 32, 38, 45 y 53 pi, empleando tres ratas de cada grupo por tiempo.

VII) Ratas Wistar de distintas edades, se inocularon por vía sc en la almohadilla plantar con 500 μ grs de ASB emulsificada en ACF. Cuatro a cinco animales por tiempo fueron sangrados por punción cardíaca los días 14, 27, 39 y 49 pi.

En todos los casos, los sueros fueron procesados individualmente a fin de determinar por hemaglutinación pasiva (ver 3.3.2.) la cinética de formación de Ac.

3.2.2.2. Lipopolisacárido (LPS)

(SIGMA, Chemical Company, St. Louis, Mo.) de Escherichia coli, serotipo N°0127:B8 extraído con fenol. Se preparó una solución madre del Ag (129). Para ello, 10 mgrs de LPS fueron disueltos en 1 ml de agua destilada estéril; la solución fue colocada en un baño de agua a 100°C durante 2' y luego diluída con 9 ml de PBS estéril a pH 7 para dar una concentración de 1 mgr/ml. La solución fue fraccionada y guardada a -20°C. En el momento de usar fue diluído en PBS pH 7.

Con la finalidad de estudiar la maduración de la respuesta humoral hacia este Ag, ratas Wistar de distintas edades fueron inoculadas con 10 μ grs de LPS en PBS pH 7 por vía ip. Cuatro a cinco animales por tiempo, de cada grupo etario, fueron sangrados por decapitación o por punción cardíaca según la edad, los días 3, 6, 8, 13, 17, 21 y 31 pi para valorar el título de Ac anti-LPS por hemaglutinación pasiva (ver 3.3.3.). Los valores obtenidos para cada edad, se compararon con los títulos de Ac observados en los mismos días post estimulación antigénica en los animales de 3 meses de vida.

3.2.2.3. 2,4-Dinitro-1-fluorbenceno (DNFB)

(BDH, Laboratory reagents). Fue diluído a la concentración deseada en una solución de acetona:alcohol (4:1) como se describió en un trabajo previo (130).

El estudio del desarrollo de la hipersensibilidad retardada (HR) se realizó en ratas Buffalo/Sim. Se utilizaron varios esquemas para determinar las dosis sensibilizante (Ds) y desencadenante (Dd) que pudieran ser empleadas en las experiencias tanto de los animales adultos como lactantes. Para ello:

VIII) Ratas adultas de 3 meses de vida fueron depiladas en el flanco derecho. 24 hs después, recibieron la Ds. Para ello, 0,02 ml del hapteno al 10% o al 5% fue aplicado sobre la piel y distribuido en una pequeña área con una varilla de borde pulido.

Para determinar la Dd que no produjese reacción "per se" se ensayaron tres dosis (0,5%; 0,3% y 0,1%) en ratas adultas que no habían recibido la Ds, contenidas en 0,02 ml que fueron aplicados de la misma forma en el pabellón de la oreja derecha. En todos los casos se utilizaron tres animales como grupo control de la Dd a diferencia de los cinco que se utilizaron para cada uno de los grupos experimentales que recibieron Ds y Dd. La reacción fue ensayada a los 7 o 14 días después de la Ds y las lecturas se realizaron a las 0, 24, 48 y 72 hs utilizando un calibre manual (ODITEST (R), H.C. Köplin, Schüchtern-Hessen, Alemania Federal) graduado a $\pm 0,05$ mm. La medida del tiempo 0 fue comparada con las otras lecturas para calcular el porcentaje de aumento del espesor de la oreja obtenido. Los resultados se expresan como el promedio de cinco valores individuales para los grupos experimentales (Ds+Dd) y de tres para los grupos controles (Dd solamente) calculados de la siguiente manera:

$$\frac{\text{Espesor de la oreja post Dd} - \text{Espesor de la oreja en el tiempo 0}}{\text{Espesor de la oreja en el tiempo 0}} \times 100$$

IX) A ratas de distintas edades, empleando ocho a diez animales de cada grupo etario, se les aplicó sobre la piel 0,02 ml de DNFB al 5% (Ds) con ligeros movimientos realizados con una varilla de borde pulido para distribuir el Ag sobre un área pequeña de la piel. Como Dd se empleó 0,02 ml del hapteno al 0,3% aplicado en el pabellón de la oreja derecha.

Como se describió en las ratas adultas para la cuantificación de la reacción de HR, el valor obtenido en el tiempo 0, fue comparado con los de las 24, 48 y 72 hs después de la Dd en forma similar al caso anterior. También se utilizó, para cada edad estudiada, un grupo de cuatro a cinco animales que solo recibieron la Dd, como grupo control.

3.3. VALORACION DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL

3.3.1. Anti-GRC

3.3.1.1. Determinación de Ac séricos: Hemaglutinación directa

Fue realizada utilizando una microtécnica. Para ello, se emplearon policubetas permanentes de 96 cavidades con fondo en "U" (MICROSERUM, Chemar S.A.C.I.F.). 0,025 ml de cada suero, inactivado a 56°C durante 30', se diluyeron al medio seriadamente con 0,025 ml de SF utilizando un microdiluidor calibrado para ese volumen (MICROTITER, Cooke Engineering CO.). Los GRC fueron empleados después de tres lavados en SF, en una suspensión al 2%. 0,025 ml de esta suspensión fueron agregados a cada dilución con una pipeta gotero (MICROTITER, Cooke Engineering CO.). Las policubetas fueron, luego, agitadas cuidadosamente y la lectura se realizó, después de 2 hs de incubación a temperatura ambiente. Se consideró como el título de Ac, la última dilución del suero en la que se observó hemaglutinación, comparando con los controles en

los cuales el suero fue reemplazado por SF.

3.3.1.2. Determinación del número de células formadoras de Ac

El número de células formadoras de IgM hacia GRC (placas directas) presentes en los bazos de los animales, fue determinado individualmente utilizando la técnica de Cunningham (131). Para obtener las células aisladas, los bazos fueron rallados en malla metálica utilizando medio MEM con gelatina y Hepes. Luego de dos lavados, las células fueron resuspendidas en 1 ml de una solución conteniendo 9 partes de Cloruro de Amonio 0,83% y 1 parte de Tris al 2,059% a pH 7,2 para hemolizar los glóbulos rojos de la suspensión (132). Después de incubar 10' en un baño de agua a 20°C se añadió a la suspensión celular 10 ml de MEM y se centrifugó a 900 rpm. Luego de dos lavados, las células fueron contadas en una cámara de Neubauer y llevadas a una concentración de $4,2 \times 10^6$ células viables/ml. La viabilidad celular se determinó por la técnica de exclusión con Azul Trypan. En un tubo se mezclaron 300 μ l de la suspensión celular, 40 μ l de GRC al 20% en SF y, como fuente de complemento, 80 μ l de suero de cobayo diluido 1/8 en SF. Con 60 μ l de la mezcla se llenaron camaritas diseñadas especialmente de manera tal que cada una alojaba 150.000 células blancas. Luego de incubar 1 h a 37°C se cuantificó el número de CFA por el conteo de las placas de hemólisis. Cada muestra se realizó por triplicado y el valor se expresó como CFA/ 10^7 células blancas.

Composición del medio utilizado:

MEM 10x 10 ml
Agua destilada 70 ml
HEPES (ácido N-2-hydroxyethylpiperazina-N-2-ethane
sulfónico; 0,0467 grs/ml).. 10 ml
Gelatina (0,05 grs/ml) 10 ml

El pH se ajustó a 7,3 con NaOH 0,5 N.

3.3.2. Determinación de Ac anti-ASB

Fue realizada por la técnica de hemaglutinación pasiva sobre GRC descrita por Whitaker (133) con algunas modificaciones. Para ello se mezclaron 9,75 ml de glutaraldehído al 0,2% con 0,24 ml de ASB diluída en PBS y 0,4 ml de sedimento de GRC lavado tres veces con PBS. Con ello se lograba una concentración final de 2 mgrs/ml de ASB. La mezcla fue incubada 1 h a temperatura ambiente con agitación constante. Finalizado el tiempo de incubación, se agregó a la mezcla 1 ml de Glicina 1 M. A partir de este momento se trabajó con PBS conteniendo 1% de suero de rata normal inactivado previamente a 56°C durante 30'. Después de tres lavados con PBS más suero, la mezcla se diluyó de manera de obtener una suspensión de GRC ligados con ASB (GRC-ASB) al 2% la que se conservó a 4°C. Para determinar el título de Ac hacia ASB y empleando placas similares a las descritas para hemaglutinación directa, 0,025 ml de cada suero de rata, inactivado a 56°C por 30', fueron diluídos al medio seriadamente con 0,025 ml de PBS

conteniendo 1% de suero normal de rata. A cada dilución se le agregaron 0,025 ml de la suspensión de GRC-ASB. Después de 2 hs de incubación a temperatura ambiente, el título de Ac se expresó como la última dilución del suero que presentó hemaglutinación.

3.3.3. Determinación de Ac anti-LPS

Fue realizada por hemaglutinación pasiva como describió Ruggiero (134). Para ello, un tubo conteniendo 5 mgrs de LPS disuelto en 5 ml de PBS pH 7, fue colocado en un baño de agua a 100°C durante 90'. 4,5 ml de esta solución se mezclaron con 0,5 ml de sedimento de GRC. La mezcla, luego de ser incubada a 37° C durante 30' fue lavada tres veces con PBS pH 7 y a partir de ella se preparó una suspensión de GRC-LPS al 1% en PBS pH 7. Para determinar el título de Ac anti-LPS se procedió de manera similar a la descripta para ASB realizando diluciones seriadas de cada una de las muestras de sueros obtenidos en los ensayos experimentales. También, como en el caso anterior, el período de incubación, fue de 2 hs y de la misma forma se interpretaron los resultados.

3.4. ESTUDIO DE LAS PROTEINAS SERICAS

3.4.1. Concentración total de proteínas séricas

Fue determinada siguiendo el método de Lowry (125) a partir de 5 μ l de los sueros de ratas Wistar de distintas edades diluidos al medio en agua destilada. Los valores se expresaron como gr de

proteínas por cada 100 ml. de suero (gr %)

3.4.2. Análisis de las proteínas séricas por electroforesis en acetato de celulosa

Para ello se utilizó un aparato ELOMED constituido por una cuba para electroforesis y una fuente de poder. 15 μ l de cada suero a estudiar fueron sembrados en tiras de acetato de celulosa de 25x160 mm (LOGOS S.P.A.) previamente sumergidas en el buffer de corrida durante 30' y secadas con papel de filtro. Las siembras, realizadas por duplicado, se corrieron en grupos de cuatro tiras por vez aplicando una intensidad de 200 V. Después de 50' de corrida, las tiras fueron coloreadas con Amido Black durante 5' y decoloradas con tres cambios de la solución decolorante durante 24 hs. Una de las siembras de cada suero fue utilizada para determinar el porcentaje relativo de las diferentes proteínas séricas. Para ello cada banda fue separada cortando la tira de acetato y sumergiendo cada trozo en 3 ml del medio de elución el cual adquiere la coloración correspondiente según la concentración proteica. A los 30' se realizó la lectura colorimétrica a 640 nm en un espectrofotómetro marca BECKMAN modelo DB-G. Para conocer el porcentaje relativo de cada una de las proteínas se realizó, para cada muestra, el siguiente cálculo utilizando como ejemplo los valores obtenidos a partir de una rata adulta de tres meses de vida:

<u>Proteína</u>	<u>D.O. (Densidad Optica)</u>
Albúmina	0,4
α_1	0,215
α_2	0,135
β	0,12
γ	0,105
TOTAL	<u>0,975</u>

Para cada proteína se calculó el porcentaje de la siguiente manera:

$$\frac{\text{D.O.} \times 100}{\text{TOTAL}}$$

En el ejemplo:

<u>Proteína</u>	<u>Porcentaje relativo (%)</u>
Albúmina	41,02
α_1	22,05
α_2	13,85
β	12,31
γ	10,77

Siendo la concentración total de proteínas séricas de 8,7 grs en 100 ml de suero, el valor absoluto para cada una de ellas, se calculó según la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Porcentaje relativo} \times 8,7}{100}$$

En el ejemplo:

.

<u>Proteína</u>	<u>Valor absoluto (grs/100 ml de suero)</u>
Albúmina	3,57
α_1	1,92
α_2	1,2
β	1,07
γ	0,94

Otra de las siembras fue sumergida en metanol durante 1' y después en un baño transparentizador durante otro minuto. Luego de colocarla entre dos portaobjetos y secarla a 37°C se realizó el perfil electroforético en un densitómetro digital 3110 marca LABORA MANNHEIM.

Reactivos empleados:

Buffer de corrida: Buffer Veronal pH 8,6

Veronal Sódico 20,6 grs
(5,5-dietil barbiturato de sodio)

Veronal 2,68 grs
(ácido 5,5-dietilbarbitúrico)

El ácido 5,5-dietilbarbitúrico fue disuelto en 200 a 300 ml de agua bidestilada con agitación constante sobre platina caliente. Luego de enfriado se mezcló con el Veronal Sódico disuelto en 1 l de agua bidestilada y la solución se llevó a volumen final de 2 l.

Colorante:

Metanol 45 ml

Agua bidestilada 45 ml

Acido acético 10 ml

Amido Black 0,5 grs

Antes de su uso fue disuelto durante una noche a 37°C y luego filtrado por papel de filtro.

Solución decolorante:

Metanol	475 ml
Agua bidestilada	475 ml
Acido acético	50 ml

Solución transparentizante:

Metanol	85 ml
Acido acético	14 ml
Glicerol	1 ml

Líquido de elución:

NaOH 1 M	5 partes
Agua destilada	5 partes
EDTA 0,1 M	0,5 partes

3.4.3. Análisis de las proteínas séricas por electroforesis en agarosa

Se empleó agarosa (BRITANIA) al 1% disuelta en buffer de corrida. Para los ensayos se utilizaron placas de vidrio de 85x100 mm sobre las que se volcaron 8 ml de la agarosa previamente fundida. Las placas fueron mantenidas durante una noche en cámara húmeda. Utilizando una lámina plástica perforada se sembraron 3 μ l de los diferentes sueros en estudio a aproximadamente 3 cm de uno de los bordes de la placa. Esto permitió la corrida simultánea de 6

o 7 muestras por cada placa de vidrio. Las corridas electroforéticas se realizaron en un aparato marca LKB Multiphor System a 20 V/cm durante 45' a 10°C. Las placas fueron sumergidas luego en una solución fijadora de ácido pícrico durante 10' y para remover el exceso de ácido pícrico, en etanol por 5' y por último en agua destilada. La película de agarosa fue reducida a una fina lámina colocando sobre ella cuatro a cinco hojas de papel de filtro y ejerciendo una presión de aproximadamente 1 kg. El papel de filtro se renovó tres veces y luego las placas fueron secadas con aire caliente. Para teñirlas, se sumergieron durante 5' en la solución colorante y luego se decoloraron con varios cambios de la solución decolorante.

Reactivos empleados:

Buffer de corrida: Buffer Tris-barbiturato pH 8,6

Acido dietil barbitúrico	22,4 grs
Tris	44,3 grs
Lactato de calcio	0,533 grs
Azida sódica	0,650 grs

Los reactivos fueron disueltos en 1 l de agua destilada con agitación constante y se almacenó a 4°C. Se utilizó en dilución 1:4.

Solución fijadora:

Acido pícrico	11,7 grs
Agua destilada	833 ml

Acido acético 167 ml

El ácido pícrico fue disuelto en el agua destilada a 60°C y luego de filtrado se le adicionó el ácido acético.

Colorante:

Amido black 10B 1,25 grs

Solución decolorante 250 ml

Se filtró por papel antes de usar.

Solución decolorante:

Etanol 225 ml

Agua destilada 225 ml

Acido acético 50 ml

3.4.4. Valoración de la concentración de IgG sérica

Se utilizó la técnica de inmunodifusión radial (IDR) descrita por Mancini (126). Para ello, a placas de plástico diseñadas para tal fin se les adicionó 4,5 ml de agarosa al 1% en buffer Tris-barbiturato pH 8,6 (ver 3.4.3.) conteniendo además 0,1% de azida sódica. La agarosa contenía suero de conejo anti-IgG de rata (se trabajó con una dilución final de 1/10 del suero). Después de permanecer, las placas, una noche a 4°C, se realizaron perforaciones en la agarosa con un sacabocados de manera de obtener orificios de 5 μ l de capacidad. Doce perforaciones realizadas en cada placa fueron sembradas con los sueros en estudio provenientes de ratas Wistar de distintas edades, ya sea puros o diluídos de mane-

ra de obtener halos de un tamaño no mayor de 13 mm de diámetro. Tres perforaciones fueron ocupadas para la realización de una curva de calibración sembrando 15, 30 y 45 μ grs de IgG. Luego de incubar 48 hs a temperatura ambiente, se midió el diámetro (d) de cada halo con una lupa marca PEAK graduada en 0,1 mm. La concentración de IgG fue expresada en mgrs/ml según la curva de calibración confeccionada.

3.4.5. Nivel de Complemento sérico

3.4.5.1. Preparación de la Mezcla Hemolítica (MH)

Fue obtenida siguiendo la metodología descripta por Miyakawa (127) con algunas modificaciones. Los GRC utilizados fueron lavados tres veces con buffer Veronal con gelatina y glucosa. Luego del conteo en cámara de Neubauer, se llevaron a concentración final de 1×10^9 GRC/ml. Una mezcla de partes iguales de la suspensión y de suero de conejo anti-GRC de origen comercial (SUDIAR S.A.) diluído previamente 1/300 en el mismo buffer, fueron mezcladas e incubadas 30' a 37°C y 30' a 4°C con agitación ocasional.

3.4.5.2. Técnica de titulación de Complemento

Para estas experiencias se utilizaron ratas Wistar de distintas edades que fueron sangradas por decapitación o por punción cardíaca según la edad. En todos los casos, la sangre, luego de su extracción, fue mantenida en frío durante 24 hs hasta la total re-

tracción del coágulo y, luego, centrifugada a 1.200 rpm durante 15'; el suero fue almacenado a -70°C hasta su procesamiento. En ese momento, los sueros fueron diluidos al medio seriadamente. A 0,2 ml de cada dilución, se le adicionó igual volumen de buffer Veronal con gelatina y glucosa y 0,1 ml de la MH. Después de incubar 1 h a 37°C , todos los tubos fueron centrifugados a 1000 rpm por 5'. Los títulos se expresaron como la dilución de suero en la que se observó 50% de hemólisis.

Reactivos empleados:

Buffer Veronal 5x:

Cl Na 41,2 grs
5,5-dietilbarbiturato
de sodio 5,095 grs
Agua destilada 700 ml

El pH fue ajustado a 7,35 y el volumen se completó hasta 1 l con agua destilada.

Buffer Veronal con gelatina y glucosa:

Gelatina 0,1 grs
Agua destilada 60 ml
Veronal 5x 20 ml

A un volumen final de 100 ml se le adicionó 100 ml de glucosa 5% con $3 \times 10^{-4}\text{M}$ de Ca y $1 \times 10^{-3}\text{M}$ de Mg.

3.5. ESTUDIO DE LAS CELULAS COMPROMETIDAS EN LA RESPUESTA INMUNE

3.5.1. Recuento y fórmula leucocitarios

Ratas Wistar de distintas edades fueron sangradas por decapitación o punción cardíaca dejando fluir la sangre en tubos heparinizados. La sangre fue diluída 1/20 en pipetas para recuento leucocitario empleando una solución conteniendo 1 ml de ClH y 2 ml de ácido acético en 100 ml de agua destilada con la adición de azul de metileno. Los leucocitos fueron cuantificados en cámara de Neubauer y los valores expresados como células blancas/mm³ de sangre. Para el estudio de la fórmula leucocitaria los frotis se colorearon con May Grunwald-Giemsa.

3.5.2. Análisis del exudado peritoneal

Las células fueron extraídas por lavado de la cavidad peritoneal con SF y colocadas en tubos plásticos mantenidos en frío. Luego de centrifugarlas 10' a 1000 rpm y resuspenderlas en volumen conocido de SF, se contaron en cámara de Neubauer. En tubos siliconados, un total de $2,5 \times 10^6$ células provenientes de animales del mismo grupo etario, fueron resuspendidas en una solución de $1/10^5$ peso/volumen de Naranja de Acridina en SF como describió Golstein (135). Los tubos se incubaron por 30' a 37°C en oscuridad. 0,02 ml de cada suspensión fueron colocados entre portaobjetos y cubreob-

jetos y observados por inmersión (100x) con epi-iluminación en un microscopio ZEISS. En un total de 100 células se determinó el porcentaje de macrófagos, linfocitos, leucocitos polimorfonucleares y mastocitos para los distintos grupos etarios.

3.5.3. Distribución de las poblaciones linfocitarias

Fue estudiada en bazo y timo de ratas Buffalo/Sim de distintas edades por la técnica de inmunofluorescencia indirecta (136). Para ello, las células fueron aisladas rallando los órganos sobre malla metálica en PBS Dulbecco conteniendo 2% de suero fetal bovino (SFB). Luego de centrifugar a 1000 rpm durante 10', los glóbulos rojos provenientes de las suspensiones se lisaron con 1 ml de una solución que contenía 9 partes de cloruro de amonio 0,83% y 1 parte de Tris al 2,059% a pH 7,2 (132). Luego de incubar en un baño de agua a 20°C se agregó a las suspensiones 10 ml de medio y se centrifugó a 1000 rpm por 10'. Tanto las células provenientes del bazo como del timo, fueron resuspendidas en 1 ml de medio y a 0,75 ml de cada suspensión se le adicionó 8 partes de sorbitol 0,308 M y 1,25 partes de glucosa 0,308 M para eliminar las células muertas (132). La suspensión celular fue filtrada a través de algodón flojo en pipetas Pasteur siliconadas y centrifugada a 1000 rpm por 10'. Las células fueron resuspendidas y contadas en cámara de Neubauer. Alícuotas conteniendo 10^7 células fueron fraccionadas en tu-

bos plásticos y centrifugadas nuevamente. A lo largo de todo el experimento, las células se mantuvieron en hielo. A partir de este momento se trabajó con PBS Dulbecco con 2% de SFB y 20 mM de azida sódica. A cada tubo se le agregó 0,1 ml de los antisueros correspondientes diluidos 1/10 según el siguiente protocolo:

TUBO N°	ORIGEN DE LAS CELULAS	ANTI-SUERO
1	Timo	SAT (ver 3.8.4.)
2	Timo	anti- γ globulina (ver 3.8.2.)
3	Bazo	SAT
4	Bazo	anti- γ globulina
5	Bazo	anti-IgG (ver 3.8.3.)

Después de incubar 30' a 4°C, se agregó a cada tubo 5 ml de PBS Dulbecco. Luego de centrifugar 10' a 1000'rpm las células se lavaron dos veces y se resuspendieron en 0,1 ml de suero de cabra anti- γ globulina de conejo marcado con isotiocianato de fluoresceína diluido 1/40 (ver 3.8.5.) y se incubaron 30' a 4°C. Al finalizar este proceso, las células fueron nuevamente lavadas tres veces y finalmente resuspendidas en 0,5 ml de medio de montaje. La observación se realizó entre porta y cubreobjetos en un microscopio ZEISS de epi-

iluminación con un aumento de 40x.

Se determinó el porcentaje de linfocitos B y T de cada suspensión sobre 100 células, considerando como positivas las células que presentaban marcación netamente en su superficie.

Medio PBS Dulbecco:

Solución I: Cl Na 40,45 grs
Cl K 1,45 grs
PO₄H₂K 1,45 grs
PO₄HNa₂.12 H₂O 21,9 grs
Agua destilada 400 ml

Solución II: Cl₂Ca 0,95 grs
Agua destilada 50 ml

Solución III: MgCl₂.6H₂O 0,95 grs
Agua destilada 50 ml

En el momento de usar se mezclan bajo agitación constante:

8 partes de I
90 partes de Agua destilada
1 parte de II
1 parte de III
2,04 partes de SFB

Medio de montaje: Tampón de solución Glicina:

Glicina 7 grs
NaOH 0,35 grs

Cl Na 8,5 grs
Azida sódica 0,5 grs
Agua destilada 500 ml

En el momento de usar se mezclan 3 partes de tampón Glicina con 7 partes de Glicerol y el pH se ajusta a 8,6.

3.6. ESTUDIOS DE HIPERSENSIBILIDAD MEDIADA POR ANTICUERPOS

Con el objeto de valorar el desarrollo de hipersensibilidad en ratas Wistar adultas y de distintas edades se realizaron dos grupos de experiencias:

X) Ratas Wistar adultas de 3 meses de vida recibieron como Ds 500 μ grs o 5000 μ grs de ASB emulsificada en ACF por vía sc en la almohadilla plantar. El día 26 pi, cuatro animales de cada lote recibieron como dosis Dd 50 μ grs de ASB sin ACF contenidos en 0,1 ml por vía intradérmica (id) en el flanco previamente depilado. Como control se utilizaron cuatro animales que sólo recibieron la Dd. La reacción cutánea fue valorada a las 4, 24 y 48 hs: 1) macroscópicamente para determinar la presencia de edema y/o eritema y 2) midiendo el diámetro de la reacción con una regla milimetrada. Se consideró como positiva toda reacción cuyo diámetro fuera superior a 10 mm.

Seis a ocho ratas de cada uno de los grupos recibieron como Dd la misma dosis de Ag en la oreja derecha en un volumen de 0,02ml

pero en este caso, la reacción fue cuantificada en la misma forma que para la hipersensibilidad de contacto(ver 3.2.2.3.) midiendo el espesor de la oreja antes de la Dd (tiempo 0) y a las 4, 24 y 48 hs de la Dd. En todos los casos también un lote de cuatro animales que sólo recibieron la Dd, se utilizaron como control. Los resultados se expresan como el promedio de seis a ocho valores individuales.

XI) Ratas Wistar de distintas edades se utilizaron siguiendo la misma metodología descrita en el esquema X empleando la Ds de 500 μ grs de ASB emulsificada en ACF, por la misma vía.

3.7. TRANSFERENCIA MATERNO FETAL DE Ac

La elección del Ag a utilizar así como la cinética de formación de Ac en hembras Wistar de 3 meses de vida se determinó luego de analizar los resultados obtenidos siguiendo los esquemas que se describen a continuación:

XII) Respuesta primaria a GRC: Las ratas fueron inoculadas con 10^9 GRC por vía sc en la almohadilla plantar. El suero de tres animales por tiempo fue obtenido por sangrado de la vena de la cola los días 4, 8, 13, 18, 22, 28, 35, 42 y 55 pi. El título de Ac se valoró por hemaglutinación directa(ver 3.3.1.1.).

XIII) Respuesta secundaria a GRC: Los animales recibieron dos inoculaciones de 10^9 GRC por vía sc separadas por 60 días de intervalo. Después de la segunda inoculación, tres ratas por tiempo fueron sangradas de manera similar a la descrita en el caso anterior, los

días 4, 8, 11, 15, 18, 23, 28 y 37 pi.

XIV) Respuesta primaria a ASB: En este caso, los animales, fueron inoculados por vía sc con 500 μ grs de ASB emulsificada en ACF en la almohadilla plantar. El título de Ac se determinó por hemaglutinación pasiva (ver 3.3.2.) utilizando el suero de tres animales por tiempo, los días 12, 19, 26, 32, 38, 45 y 53 pi.

XV) Respuesta secundaria a ASB: Separadas por un intervalo de 63 días, las ratas recibieron dos inoculaciones de la dosis empleada para el estudio de la respuesta primaria y por la misma vía. Se sangraron tres animales por tiempo los días 3, 6, 10, 14, 19, 24, 31, 41, 48 y 59 de la segunda inoculación del Ag.

Para las experiencias de transferencia materno-fetal de Ac, las hembras fueron inmunizadas siguiendo el esquema XIV. 16 días más tarde comenzó el período de apareamiento. Los nacimientos se registraron controlando los animales dos veces por día. Para valorar el título de los Ac maternos anti-ASB a lo largo de la experiencia, las madres fueron sangradas por el corte de la vena de la cola inmediatamente después de la parición y cuando el ensayo concluía, es decir, en el momento en el cual todas sus crías habían sido sacrificadas a fin de valorar el nivel de Ac circulantes anti-ASB. Otro lote de ratas adultas sin estimulación antigénica se aparearon en el mismo tiempo que las anteriores con el objeto de obtener pariciones simultáneas con el grupo anterior. Esto permitió realizar inter

cambio de las crías y analizar entonces la magnitud de la transferencia de Ac por tejidos fetales o por leche.

3.8. METODOLOGIA EMPLEADA EN LA PREPARACION DE ANTISUEROS

3.8.1. Suero de conejo anti-suero total de rata

Se utilizó un pool de sueros provenientes de ratas Wistar de 3 meses de vida al cual se le determinó la concentración total de proteínas por el método de Lowry (125). El valor obtenido fue de 90 mgrs/ml. Tres conejos de alrededor de 3 Kgrs de peso fueron inmunizados como se describió previamente (137). Para ello, recibieron dos dosis por vía sc de 2 mgrs de proteínas en ACF separadas por 7 días de intervalo. 14 días después de la segunda inoculación se les administró a los conejos, en tres días sucesivos, una nueva dosis por vía sc de 0,1 mgrs de proteína y dos dosis de 1 y 10 mgrs por vía endovenosa (ev) respectivamente. Estas tres últimas dosis sin ACF. 7 días después de la última estimulación antigénica, los animales se sangraron y el suero de cada conejo se valoró por precipitación en medio líquido (ver 3.10.) y por inmunoelectroforesis (IEF) (ver 3.9.) utilizando como antígeno suero total de rata.

3.8.2. Suero de conejo anti- γ globulina de rata

Las γ globulinas se purificaron por precipitación salina con sulfato de amonio. A 30 ml de suero proveniente de ratas Wistar adultas se agregó gota a gota 30 ml de una solución saturada de sull

fato de amonio a saturación con agitación constante. Después de centrifugar 15' a 10.000 rpm, el precipitado se resuspendió en 15 ml de SF. La operación se repitió con 15 ml de sulfato de amonio a saturación y el precipitado fue resuspendido nuevamente en 15 ml de SF y dializado contra 5 l de SF con tres cambios durante tres días. Luego de centrifugar a 1500 rpm durante 15', el sobrenadante se conservó a -20°C. El material fue analizado por IEF (ver 3.9.) contra suero de conejo anti-suero total de ratas y la concentración de proteínas fue determinada por el método de Lowry (125). El suero anti- γ globulina de rata se obtuvo por inoculación a tres conejos de alrededor de 3 Kgrs de peso los que fueron inmunizados siguiendo el mismo esquema de inoculación descrito en el punto 3.8.1. Se determinó el grado de pureza de los anti-sueros así obtenidos por precipitación en medio líquido (ver 3.10.) con γ -globulina de rata y por IEF (ver 3.9.) contra suero total de rata. Por inmunofluorescencia indirecta (ver 3.5.3.) sobre células de bazo de rata adulta, se determinó la dilución óptima a utilizar en las experiencias destinadas a la determinación del porcentaje de linfocitos B en ratas de distintas edades.

3.8.3. Suero de conejo anti-IgG de rata

A partir de una solución de γ -globulinas obtenida como se describió anteriormente, fue aislada la IgG mediante cromatografía de intercambio iónico. Para ello, la solución de γ -globulinas

fue dializada contra buffer Tris-ClH 0,2 M pH 8 durante 24 hs a 4°C. Luego de la diálisis, la solución se corrió a través de una resina DEAE Sephadex A-50 (PHARMACIA FINE CHEMICALS) utilizando una columna (2,6 x 40 cm) (K 26/40, PHARMACIA FINE CHEMICALS) equilibrada con el mismo buffer. La lectura a 280 nm de fracciones de 6 ml, obtenidas variando la fuerza iónica del buffer de elución con un gradiente de ClNa desde 0,05 M a 0,5 M en el mismo buffer, puso en evidencia dos picos los que fueron analizados por IEF (ver 3.9.) contra suero de conejo anti-suero total de rata. Uno de los picos fue recromatografiado en las mismas condiciones y las fracciones obtenidas fueron leídas a 280 nm. Los picos resultantes se reanalizaron por IEF. La mezcla de las fracciones que contenían IgG se desaló a través de Sephadex G-25 (PHARMACIA FINE CHEMICALS). La IgG así purificada fue liofilizada durante 48 hs utilizando un liofilizador marca ELIOVAC y almacenada en un desecador a 4°C. Este material fue analizado por inmunodifusión en gel utilizando sueros standard de origen comercial (ver 3.11.). La cantidad total de proteína obtenida fue valorada por la técnica de Lowry (125).

Conejos de 3 Kgrs de peso se inmunizaron siguiendo el esquema descrito en el punto 3.8.1. Los Ac anti-IgG fueron valorados por precipitación en medio líquido (ver 3.10.) empleando IgG de rata y por IEF contra suero total de rata. Por inmunofluorescen-

cia indirecta (ver 3.5.3.) sobre células de bazo de rata adulta se determinó la dilución óptima a utilizar en los estudios realizados con el objeto de determinar el porcentaje de linfocitos B que llevan IgG en su superficie en ratas de distintas edades.

Buffer Tris-ClH 0,2 M:

Tris 12 grs

Agua destilada 900 ml

Se ajusta el pH a 8,2 con ClH 10 N y luego se completa hasta 1 l con agua destilada.

3.8.4. Preparación de suero de conejo anti-timocito de rata (SAT)

Tres conejos de 3 Kgrs de peso fueron inoculados según ya se ha descrito (138) por vía sc con timocitos en ACF (10^8 células/conejo) obtenidos de ratas de 3 semanas de vida. A las tres semanas cada animal recibió tres reinoculaciones durante tres días por vía ev de 10^8 timocitos sin ACF. Los conejos se sangraron una semana más tarde y el suero, luego de inactivarlo a 56°C por 30', fue adsorbido dos veces con glóbulos rojos de rata adulta (ver 3.12.) y una vez con polvo de hígado de rata (ver 3.13.). Luego fue centrifugado a 10.000 rpm por 1 h y almacenado a -20°C. La actividad del SAT obtenido de cada conejo, se determinó por cuatro procedimientos:

1) In vivo: Por inoculación de 0,2 ml por vía ip a ratas Wistar adultas. Como control se utilizó suero normal de conejo (SNC). Se determinó, entonces, el descenso en el número de leucocitos circulando

tes a las 0, 4, 24 y 48 hs pi. Se consideraron activos los sueros que produjeron una disminución de más del 50% de los valores normales de leucocitos durante 48 hs.

2) In vitro: Por ensayo de citotoxicidad mediada por complemento (ver 3.14.).

3) Por PAP (Peroxidasa-anti-peroxidasa) sobre cortes de bazo y nódulos linfáticos de rata adulta (ver 3.15.)

4) Por inmunofluorescencia indirecta (ver 3.5.3.) utilizando una suspensión de células tímicas provenientes de ratas de 3 a 4 semanas de edad. Se probaron diluciones seriadas al medio del suero para determinar la óptima a utilizar en las experiencias.

3.8.5. Preparación de γ -globulina de cabra anti- γ -globulina de conejo marcada con isotiocianato de fluoresceína

La γ -globulina se obtuvo siguiendo la metodología ya detallada en el punto 3.8.2. Una cabra recibió dos dosis de 500 μ grs de proteína cada una en ACF por vía intramuscular (im) separadas por 15 días de intervalo. Diez días después de la última inoculación se le administró 0,1 mgrs de proteína por vía ev sin ACF y 24 hs más tarde otros 10 mgrs por la misma vía. A los 15 días el suero fue valorado por precipitación en medio líquido (ver 3.10.). Las γ -globulinas de cabra fueron purificadas por la metodología ya descrita y se utilizaron para la preparación del conjugado con isotiocianato

de fluoresceína. Para ello, a 16 ml de γ -globulinas de cabra al 1,2% en SF se agregó 2,5 ml de SF, 2,5 ml de buffer bicarbonato-carbonato y 20 mgrs de isotiocianato de fluoresceína. La mezcla fue agitada durante 16 hs a 4°C y luego dializada a 4°C durante 8 días con cambios diarios contra 1 l de PBS. El conjugado se centrifugó luego a 12.000 rpm durante 15' a 4°C y el sobrenadante, adsorbido con polvo de hígado (ver 3.13), fue fraccionado y almacenado a -20°C. Por inmunofluorescencia indirecta se determinó la dilución óptima para ser utilizada en los ensayos.

Buffer bicarbonato-carbonato:

CO_3Na_2	1,1 grs
CO_3HNa	3,3 grs
Agua destilada	100 ml

Se ajustó el pH a 9 y se guardó a 4°C. Es una solución 0,5 M.

3.9. INMUNOELECTROFORESIS (IEF)

Técnica descrita por Grabar (139). Fue realizada sobre placas de vidrio de 85 x 100 mm sobre las que se volcaron 8 ml de agarosa 1% en buffer Tris-barbiturato pH 8,6 (ver 3.4.3.). Las placas se conservaron una noche a 4°C. Se realizaron perforaciones en la agarosa utilizando sacabocados que permiten una capacidad de 2 μ l (para suero entero), 5 μ l (para γ -globulinas e IgG) y 10 μ l (para las fracciones obtenidas de las columnas). Sobre un molde de acrílico diseñado para cinco muestras se marcaron las canaletas sobre la agarosa

y se sembraron las muestras. Las corridas se realizaron en un aparato LKB Multiphor System a 10 V/cm durante 1 h a 10°C utilizando el buffer Tris-barbiturato pH 8,6. Al finalizar las corridas, se extrajo el contenido de las canaletas las que se llenaron con 100 μ l del anti-suero correspondiente según el caso. Las placas fueron mantenidas en cámara húmeda durante 48 hs. Al cabo de este tiempo, se llenaron, tanto las perforaciones como las canaletas, con agua destilada y las placas se cubrieron con cuatro a cinco hojas de papel de filtro, ejerciendo sobre ellas una presión de aproximadamente 1 Kgr. Las hojas de papel de filtro humedecidas se reemplazaron por secas tres veces y al finalizar este procedimiento las placas se colocaron en un baño de ClNa 0,1 M con agitación durante 2 hs. Este proceso fue repetido por segunda vez completándose el secado con aire caliente. Las placas se colorearon con Amido Black (ver 3.4.3.) durante 5' y decoloraron con sucesivos cambios de solución decolorante (ver 3.4.3)

3.10. PRECIPITACION EN MEDIO LIQUIDO

Esta técnica fue empleada para valorar los sueros de los conejos inmunizados con suero total, γ -globulina, IgG de rata así como también el suero de la cabra inmunizada con γ -globulina de conejo.

El protocolo empleado fue el siguiente:

N° de Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
μ grs de Ag en 0,45 ml de PBS	0	10	20	50	100	150	200	250	350	450	450	-
anti-suero (ml)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	-	0,1
PBS (ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	0,45

Los tubos fueron incubados 1 h a 37°C y una noche a temperatura ambiente. Luego de centrifugarlos a 1.500 rpm durante 10' se observó la formación de precipitado en el fondo de los tubos.

El suero de conejo anti-IgG de rata fue valorado también por diluciones seriadas al medio desde 1/1 hasta 1/80 siguiendo el mismo protocolo para cada dilución, con el objeto de ser utilizado en IDR para la cuantificación de IgG sérica en ratas de distintas edades.

3.11 INMUNODIFUSION BIDIMENSIONAL EN GEL

Técnica de Outcherlony (140). En este caso se emplearon también placas de vidrio de 85 x 100 mm sobre las cuales se volcaron 8 ml de agarosa 1%. 24 hs más tarde se realizaron perforaciones en la agarosa utilizando sacabocados que realizan orificios de 5 μ l de capacidad separados por 5 mm en los cuales se sembraron:

En el orificio central: Suero de cabra anti-IgG de rata de origen comercial (10 mgrs/ml) diluído 1/2. Este suero se enfrentó con

- a) IgG de rata obtenida en el laboratorio.
- b) IgG de rata de origen comercial (20 mgrs/ml).
- c) γ -globulina de rata obtenida en el laboratorio.
- d) Suero total de rata.
- e) γ -globulina de rata de origen comercial (20 mgrs/ml).

Todos los sueros de origen comercial provienen de CAPPEL LABORATORIES, INC. USA.

La lectura se realizó después de 48 hs a temperatura ambiente.

3.12. METODO EMPLEADO PARA LA ADSORCION DEL SAT CON GLOBULOS ROJOS

Ratas Wistar adultas se sangraron por punción cardíaca y su sangre, colocada en tubos conteniendo citrato de sodio al 5%, fue conservada a 4°C. El SAT fue mezclado en relación 1:3 con el sedimento de glóbulos rojos previamente lavados tres veces con SF. Luego de incubar 1 h a temperatura ambiente con agitación ocasional, la mezcla fue centrifugada a 1.200 rpm durante 15'. Este procedimiento fue realizado dos veces y al finalizar la última centrifugación, el SAT se extrajo con Pipeta Pasteur y luego de fraccionarlo se conservó a 4°C.

3.13. METODO EMPLEADO PARA LA ADSORCION CON POLVO DE HIGADO

Se siguió la técnica descripta por Johnson (141). A cuatro hígados (aproximadamente 25 grs) de ratas Wistar adultas macerados en mor

tero conteniendo 50 ml de SF, se le agregaron 400 ml de acetona con agitación constante. La mezcla se centrifugó a 1.800 rpm durante 15' a 4°C. El residuo sólido fue lavado cuatro veces con 200 ml de SF cada vez. El residuo resultante fue resuspendido en 50 ml de SF y se le agregó, con agitación constante, 200 ml de acetona. Luego de una nueva centrifugación, el residuo fue resuspendido en 200 ml de acetona. Alícuotas de 25 ml fueron colocadas en papel de filtro dentro de un filtro Buchner conectado a una bomba de vacío y lavadas cuatro veces con 25 ml de acetona cada vez. Los papeles conteniendo el polvo de hígado fueron secados a 37°C durante una noche y el residuo seco fue pulverizado en un mortero. Una dilución al 1/2 del suero se mezcló con el polvo de hígado en proporción 100 mgrs/ml de suero puro. Se mantuvo una noche a 4°C con agitación constante. Luego de centrifugar a 10.000 rpm durante 15', el sobrenadante fue fraccionado y conservado a -20°C.

3.14. TITULACION DEL SAT POR LA TECNICA DE CITOTOXICIDAD MEDIADA POR COMPLEMENTO

Se siguió el método descrito por Barth (142). Timos provenientes de dos ratas Wistar de 30 días de vida fueron colocados en placas conteniendo buffer Tris pH 7,2 y rallados en malla metálica. Las suspensiones celulares obtenidas se centrifugaron a 1.000 rpm durante 10' y el contenido celular del pellet, resuspendido en el mismo

buffer, fue contado en una cámara de Neubauer. Para el ensayo, las células fueron diluídas en el mismo buffer de manera de obtener una concentración final de 20×10^6 células/ml. El ensayo de citotoxicidad se realizó según el siguiente protocolo:

N° de tubo	1	2	3	4	5	6	7	8
Dilución de SAT (0.05 ml)	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/10	-
Células (20×10^6 cel/ml) (ml)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Suero de cobayo diluído 1/4 (ml)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	-	0,1
Buffer Tris pH 7,2	-	-	-	-	-	-	0,1	0,05

Se empleó suero fresco de cobayo diluído 1/4 en buffer, como fuente de complemento. Luego de incubar 1 h a 37°C se determinó el porcentaje de células viables por la técnica de exclusión con Azul Tripán.

Buffer Tris:

Tris 0,2 M 50 ml
 ClH 0,2 M 44,2 ml
 Agua destilada 105,8 ml

Cl_2Ca 17 mgrs

$\text{Cl}_2\text{Mg} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 100 mgrs

El pH de esta solución fue de 7,4. Luego se añadieron 3 mgrs de Cl_2Ca y 1,7 grs de ClNa . El pH se ajustó a 7,2 con ClH 0,2 N.

3.15. PAP (PEROXIDASA-ANTIPEROXIDASA)

Fue realizada siguiendo la técnica de inmunomarcación enzimática (143) por el Dr. Eduardo Lascano en la Cátedra de Microbiología, Parasitología e Inmunología de la Facultad de Medicina (UBA). Para ello se utilizaron cortes histológicos de bazo y nódulos linfáticos de rata adulta los cuales fueron incubados sucesivamente con los siguientes elementos:

1) SAT: distintos cortes se emplearon para ensayar varias diluciones de este antisuero.

2) Suero de cabra anti- γ globulina de conejo diluída 1/100.

3) Peroxidasa-antiperoxidasa obtenida en conejo (CAPPEL LAB) diluída 1/100.

Los cortes fueron lavados extensivamente con buffer Tris salino 0,05 M pH 7,6 después de la aplicación de cada antisuero. La reacción fue revelada con diaminobencidina con 0,05% de peróxido de hidrógeno bajo control microscópico.

3.16. HISTOLOGIA

Los estudios histológicos fueron realizados por el Dr. Nor-

berto Sanjuan en la Cátedra de Microbiología, Parasitología e Inmunología de la Facultad de Medicina (UBA). Los tejidos fueron fijados en formol al 10% durante 48 hs. Luego fueron deshidratados sucesivamente con alcohol etílico 70°, 96° y 100° durante 6 hs cada vez. Después de realizar la clarificación con xileno durante 3 hs, los tejidos fueron sumergidos en un baño de parafina durante 3 hs con dos cambios. La inclusión se realizó en parafina y los cortes, de 7 μ m de espesor fueron coloreados con Hemalumbre de Mayer-eosina.

3.17. ANALISIS ESTADISTICO

Fue realizado con la prueba t de Student. Se tomaron como significativos los valores de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. ESTUDIO DE LAS PROTEINAS SERICAS

4.1.1. Concentración total de proteínas séricas

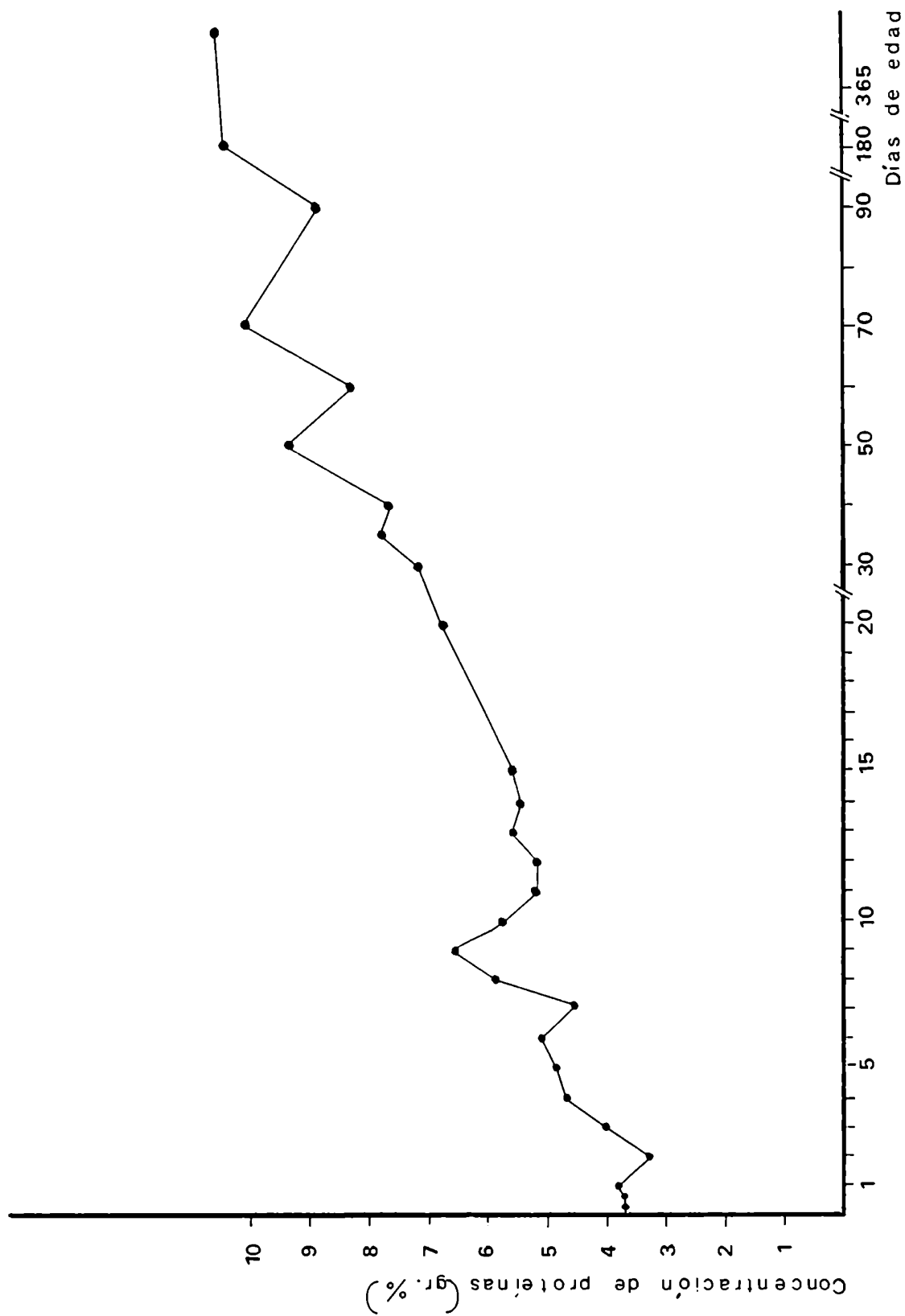
Como se mencionó en Materiales y Métodos fue determinada por la técnica de Lowry empleando ratas de distintas edades. La Figura N°1 muestra los resultados obtenidos. Cada punto representa el promedio de por lo menos 3 valores individuales. Puede observarse que la concentración hallada en el animal adulto fue de 9-10,5 gr % a diferencia de las ratas recién nacidas (entre 1 y 3 días de vida) donde el valor osciló entre 3-4 gr%. El porcentaje fue paulatinamente aumentando con la edad de los animales, hasta alcanzar un valor homologable al del adulto aproximadamente a los 50 días de vida.

Cuando se analizaron las distintas proteínas séricas por electroforesis en acetato de celulosa y en agarosa, se corroboraron estos resultados ya que las muestras provenientes de ratas recién nacidas resultaron débilmente teñidas si se las compara con las de los animales de 3 meses de vida (Fotos 1, 2, 3, 4, 5 y 6).

4.1.2. Análisis de las proteínas séricas:

Los porcentajes relativos de cada una de las

Figura N° 1: Proteínas séricas totales. Variación con la edad.



Fotos N° 1 y 2: Electroforesis en acetato de celulosa de sueros de ratas Wistar de distintas edades.



6 horas

18 horas

24 horas

30 horas

36 horas

48 horas

5 días

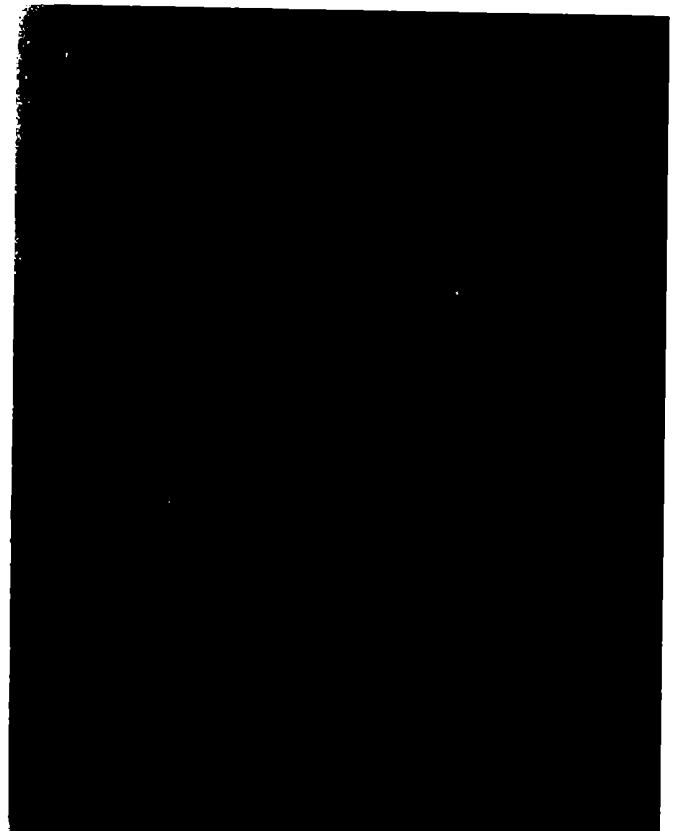
6 días

7 días

8 días

9 días

10 días



Fotos N° 3 y 4: Electroforesis en acetato de celulosa de sueros de ratas Wistar de distintas edades.



11 días

14 días

15 días

20 días

30 días

40 días

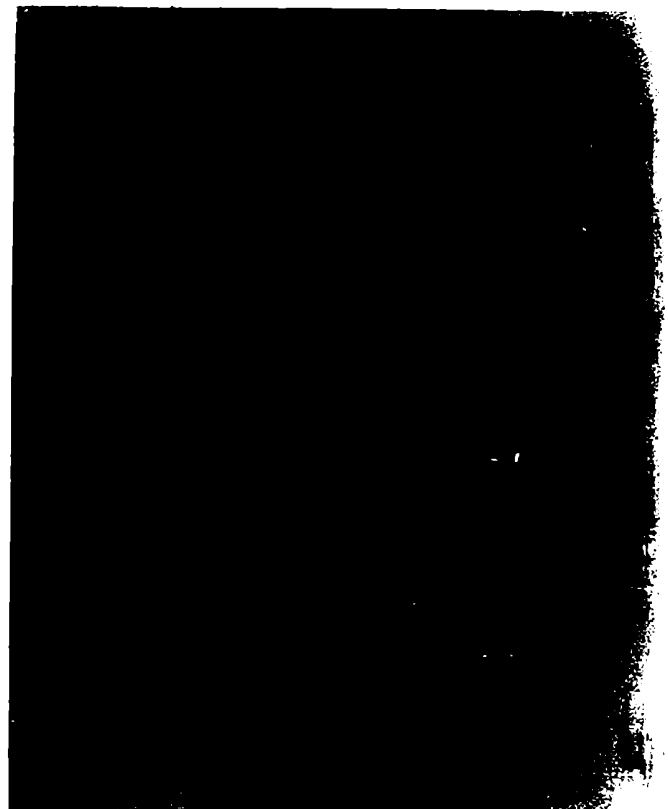
50 días

60 días

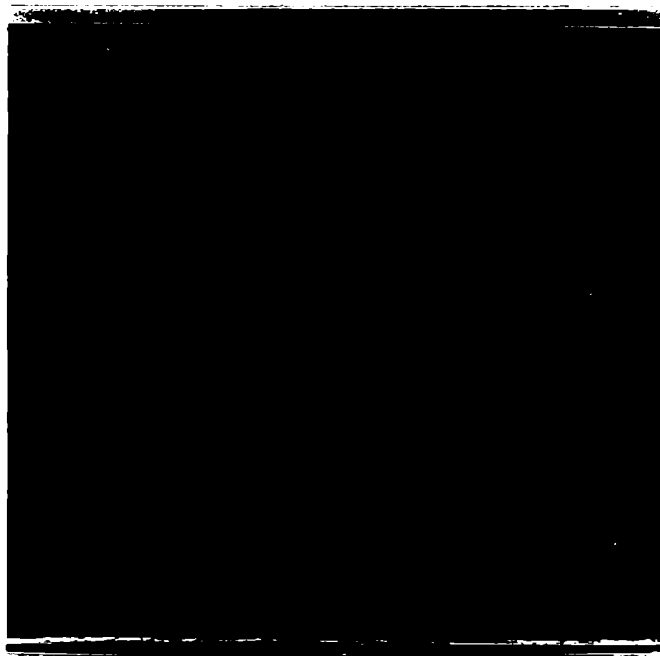
3 meses

6 meses

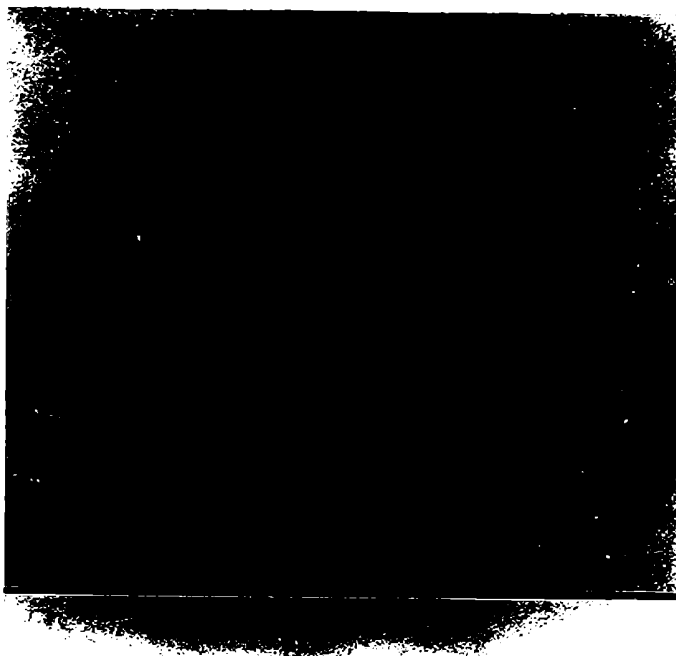
1 año



Fotos N° 5 y 6: Electroforesis en agarosa de sueros de ratas Wistar de distintas edades.



3 meses
18 horas
1 día
2 días
3 días
4 días
5 días



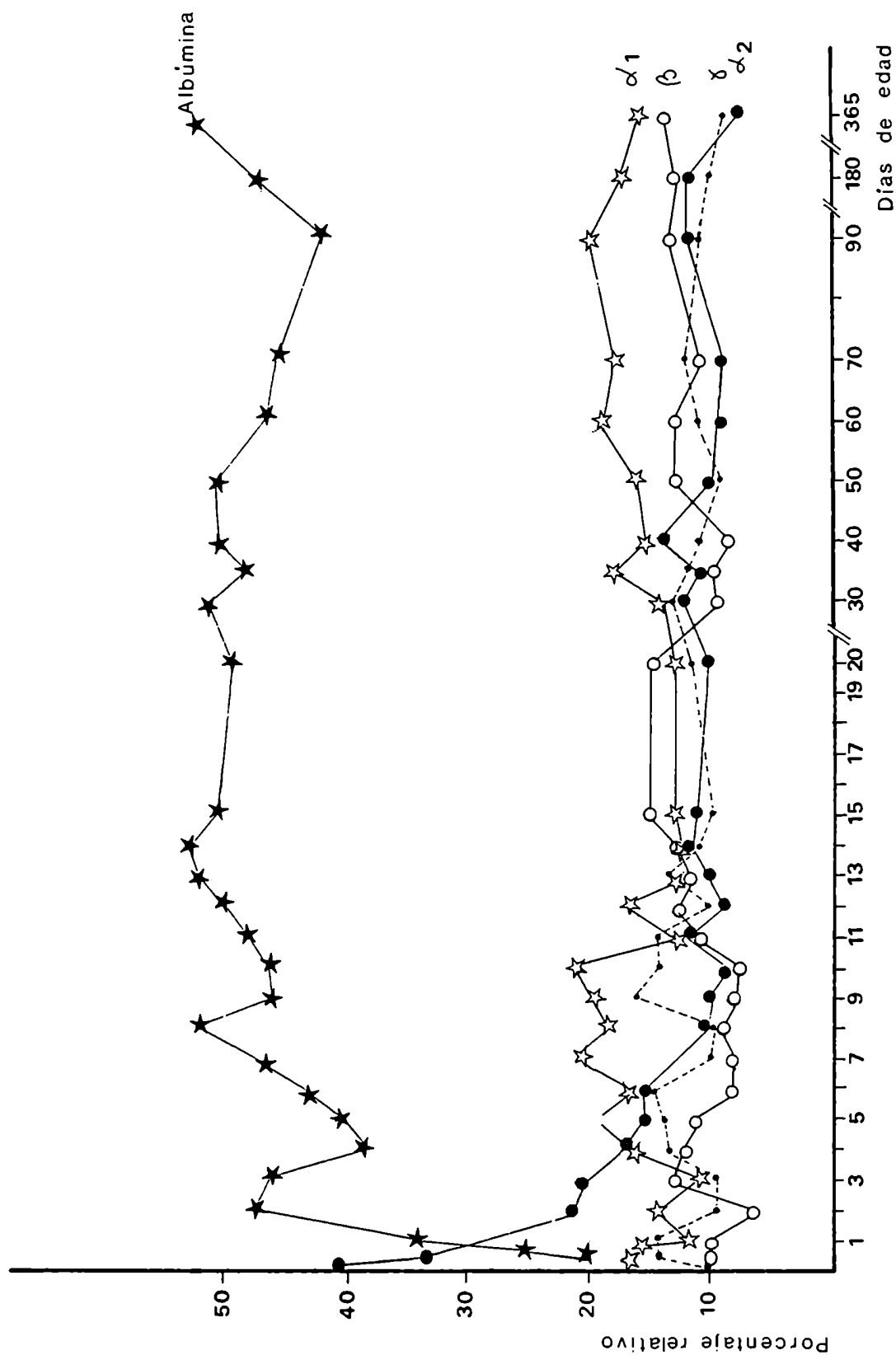
6 días
7 días
3 meses
8 días
9 días
10 días

proteínas determinados por elución de cada banda y lectura colorimétrica a 640 nm están representados en la Figura N°2. Puede observarse que en todas las edades estudiadas, inclusive adultas, los valores fueron similares ya que las correspondientes a las α_1 -globulinas oscilaron entre 11-22%, las de las β -globulinas entre 8-15% y las de las γ -globulinas entre 9-16%.

Fue evidente que los porcentajes de albúmina y α_2 -globulinas variaron según la edad. En el animal adulto la albúmina representó entre 45 y 55% y la α_2 entre 8 y 15% a diferencia de los valores observados en las ratas recién nacidas (entre 24 hs y 1 día de vida) en las cuales la albúmina está disminuída (20-30%) y la α_2 aumentada (30-40%). Estos valores se acercan a los del animal adulto en ratas de edades posteriores alcanzándolos a los 2 días de vida aproximadamente, para la albúmina y a los 7 días para la α_2 .

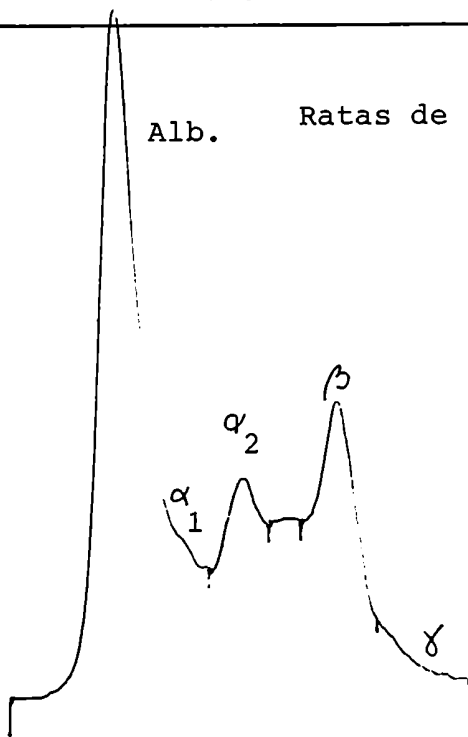
Estas diferencias pueden apreciarse en las corridas electroforéticas que se observan en las Fotos N°1 a 4. Cuando las corridas electroforéticas fueron analizadas en un densitómetro, el perfil proteico obtenido, correspondiente a cada edad, volvió a corroborar los resultados anteriores: en las ratas recién nacidas todos los picos fueron bajos si se los compara con los de la rata de 3 meses de vida lo que indica que la concentración proteica total fue menor. Por otra parte el pico correspondiente a la α_2

Figura N° 2: Porcentaje relativo de los 5 componentes proteicos principales del suero de la rata Wistar y su variación con la edad.



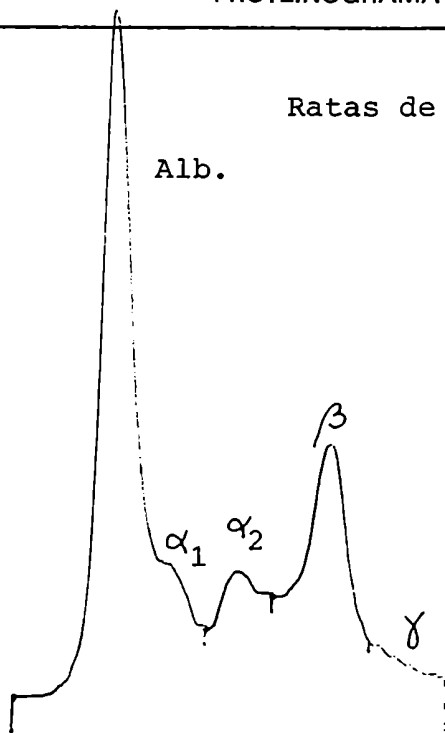
PROTEINOGRAMA ELECTROFORETICO

Alb. Ratas de 1 día de edad

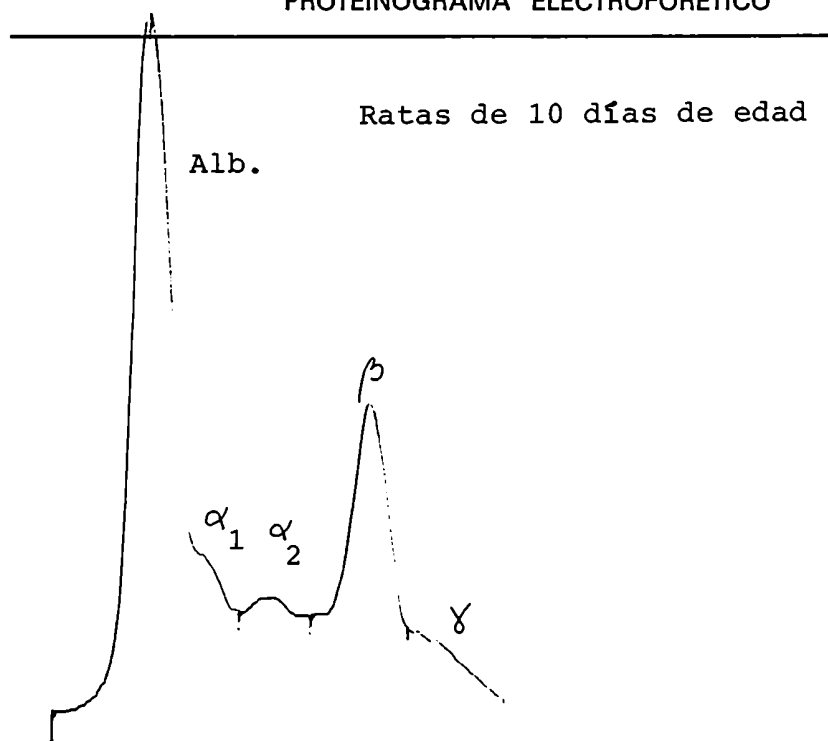


PROTEINOGRAMA ELECTROFORETICO

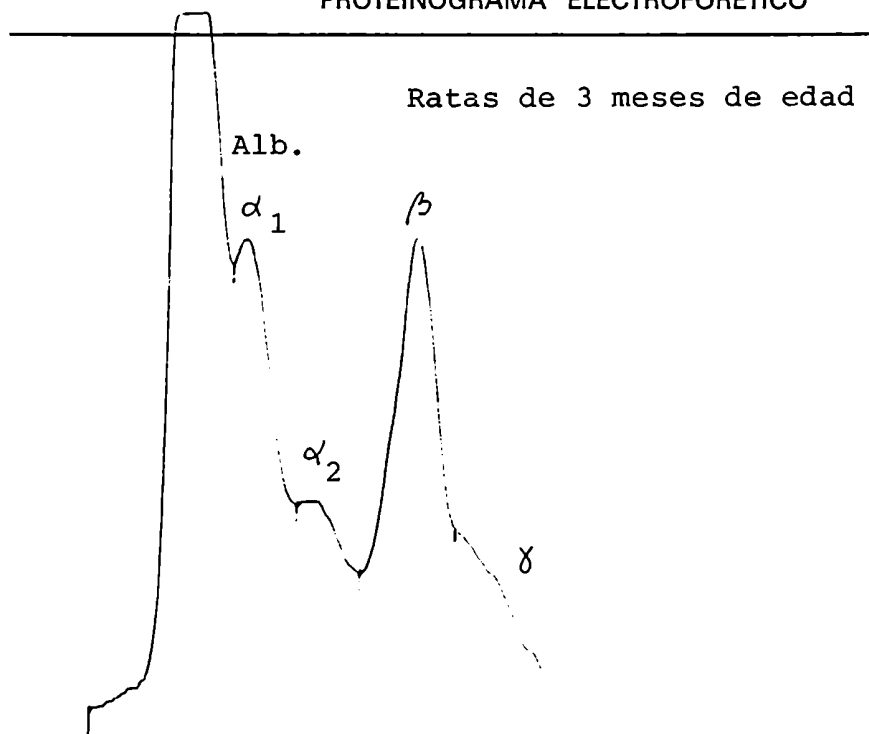
Alb. Ratas de 3 días de edad



PROTEINOGRAMA ELECTROFORETICO



PROTEINOGRAMA ELECTROFORETICO



que se obtiene en las ratas recién nacidas resultó más alto que el control de 3 meses.

Es de hacer notar que si bien los porcentajes relativos de cada proteína sérica alcanzan los valores observados en la Figura N°2, cuando se calcularon las concentraciones absolutas de cada una de ellas en base a la cantidad total de proteínas por 100 ml de suero, se encontró que los sueros provenientes de ratas recién nacidas presentaban valores más bajos si se los comparaba con los hallados en la rata de 3 meses de vida (Figura N°3) aumentando lentamente con la edad. Como fue dicho sólo la α_2 presentó niveles más altos durante las primeras horas del nacimiento (1,48 gr %) descendiendo hasta los 12 días de vida aproximadamente (0,47 gr%) para ascender nuevamente hasta alcanzar los valores absolutos correspondientes al animal adulto entre los 30 y 40 días de vida (1,07 gr%).

4.1.3. Concentración de IgG sérica:

Para determinar la concentración de IgG sérica, el primer paso que se siguió fue la purificación, por cromatografía, de IgG a partir del suero de rata adulta como se describió en Materiales y Métodos.

La Figura N°4 representa la lectura a 280 nm correspondiente a las fracciones obtenidas. El primer pico considerado hasta

Figura N° 3: Concentración absoluta (grs %) de los 5 componentes proteicos principales del suero de la rata Wistar y su variación con la edad.

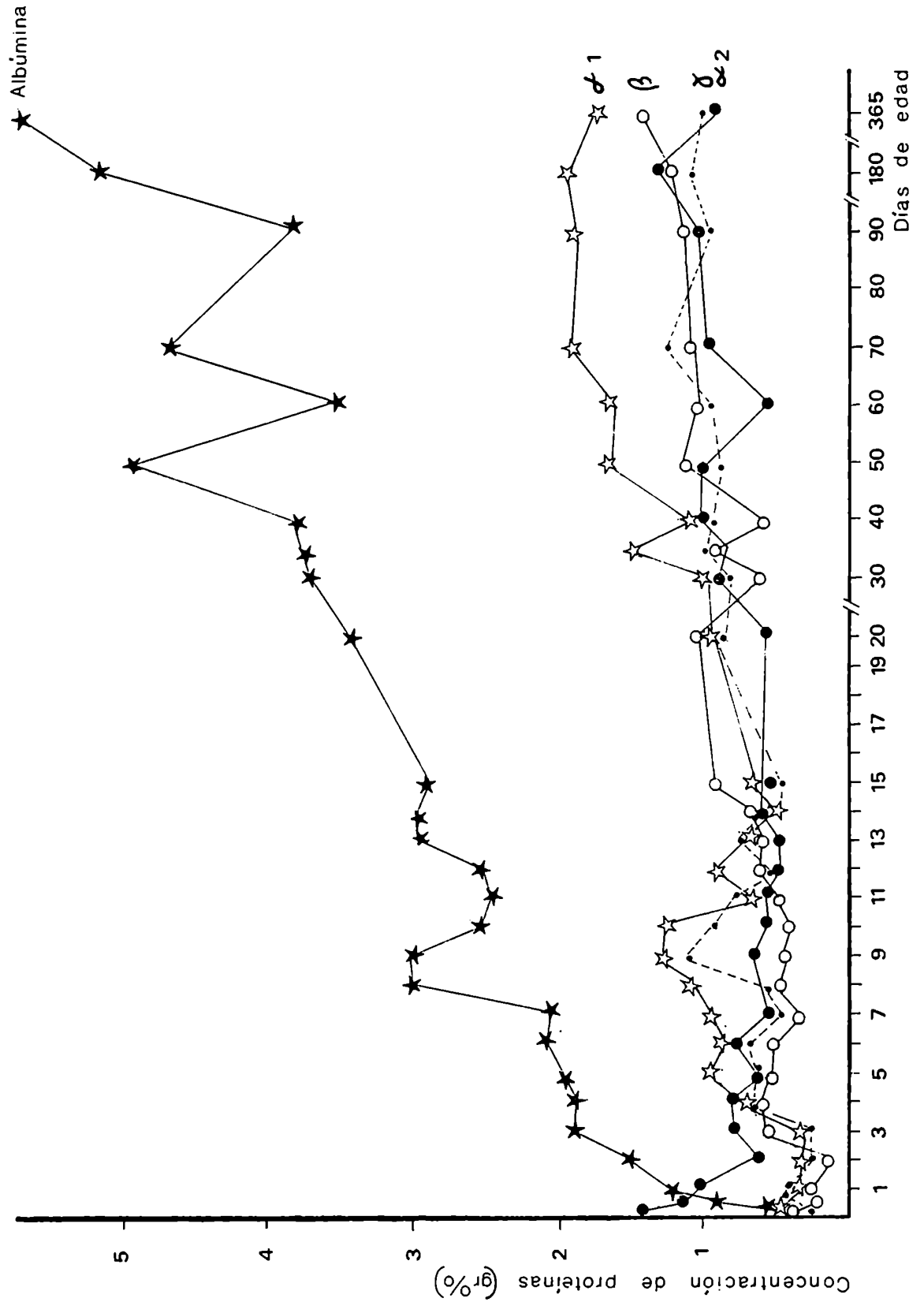
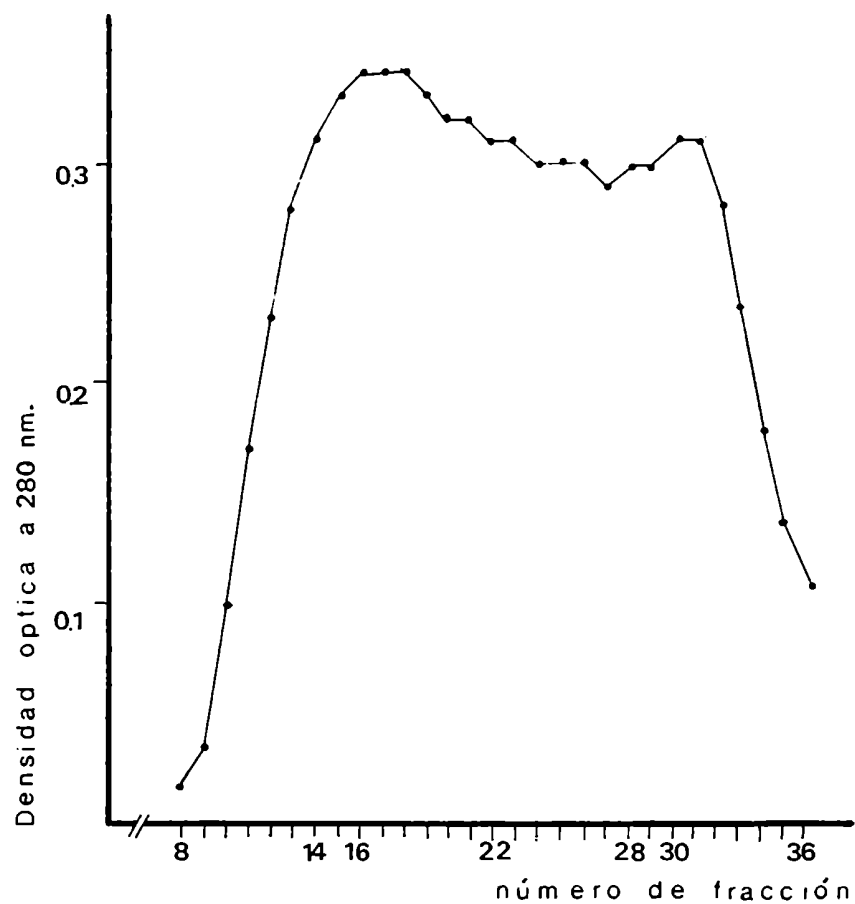


Figura N° 4: Cromatografía de γ -globulina de rata Wistar sobre DEAE-Sephadex A₅₀



la fracción N°19 presentó una banda ubicada en la zona correspondiente a la IgG, cuando se analizó por IEF. El segundo pico, considerado hasta el final de la cromatografía presentó tres bandas y por lo tanto fue recromatografiado. El perfil obtenido nuevamente se observa en la Figura N°5. El primer pico presentó, por IEF, una banda en la zona correspondiente a la IgG como se muestra en la Foto N°7.

La calidad y pureza del material obtenido después de liofilizar las fracciones que contenían IgG, fueron analizadas, como se describió en el punto 3.11 de Materiales y Métodos por inmunodifusión bidimensional en gel utilizando sueros standard de origen comercial.

Todas las soluciones presentaron una banda de precipitación cuando se las enfrentó con suero de cabra anti-IgG de rata de origen comercial observándose reacción de identidad entre todas ellas.

La cantidad total de IgG obtenida fue de 73,9 mgrs. Este material fue utilizado para la preparación de suero de conejo anti-IgG de rata.

Con el objeto de utilizar este suero en IDR, para valorar la concentración de IgG sérica en ratas de distintas edades se determinó, por precipitación en medio líquido, la dilución óptima a utilizar. Para ello se emplearon diluciones desde 1/1 hasta

Figura N° 5: Recromatografía del 2do. pico sobre DEAE-Sephadex A₅₀.

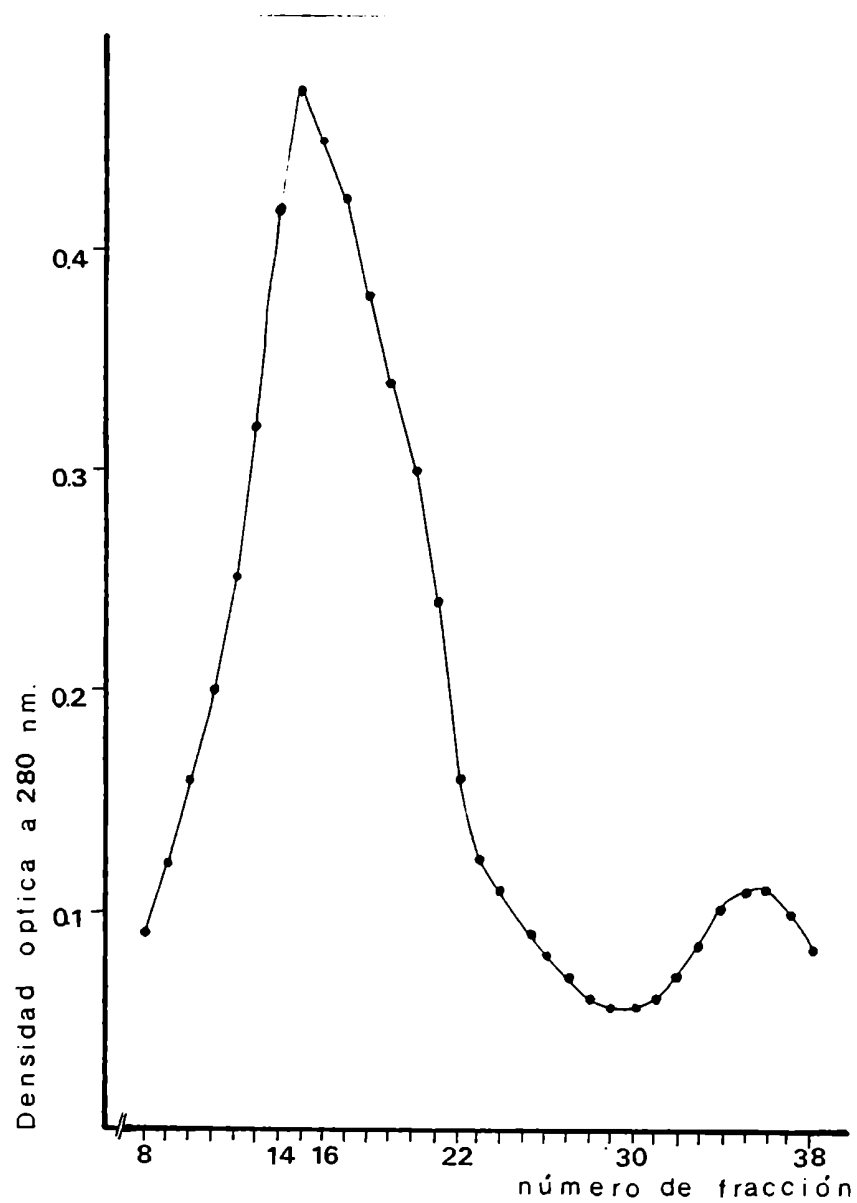
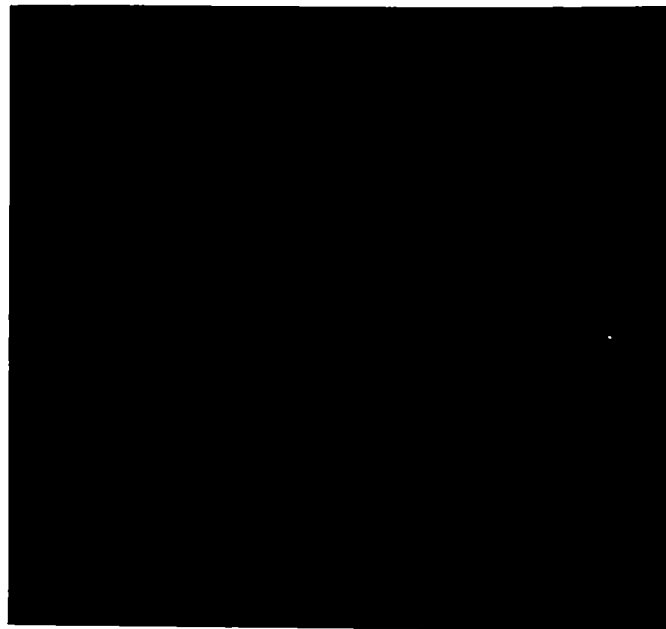


Foto N° 7: Immunolectroforesis del primer pico obtenido por cromatografía sobre DEAE Sephadex A₅₀ de γ -globulina de rata Wistar adulta.



Fracción N° 14

" " 15

" " 16

" " 17

" " 18

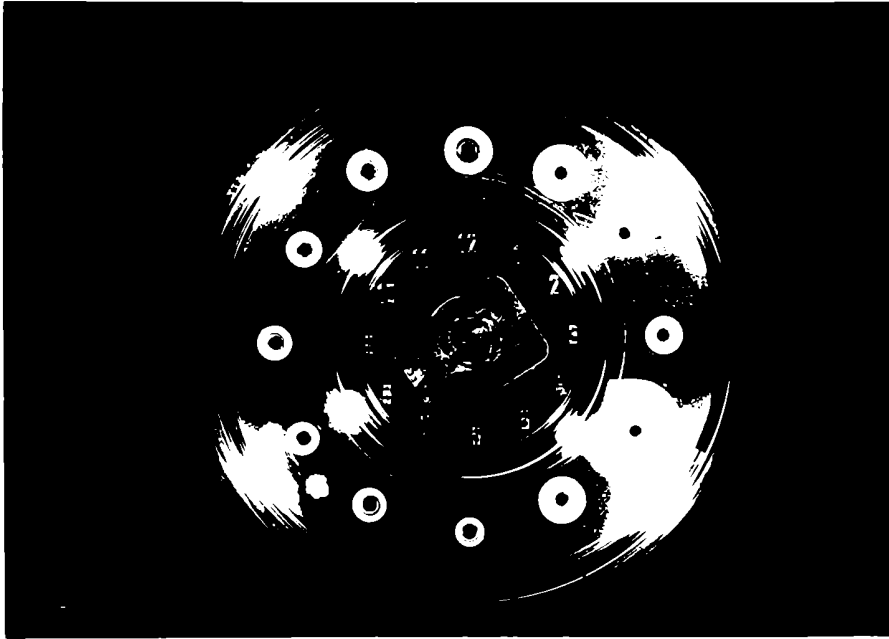
En las canaletas se sembró suero de conejo anti-suero total de rata.

1/80 con cada una de las cuales se siguió el protocolo descrito en el punto 3.10. Se observó formación de precipitado en todos los tubos correspondientes a las diluciones 1/1 y 1/10, por lo tanto esta última dilución fue la elegida.

En la Foto N°8 se observan los resultados obtenidos por IDR utilizando una placa con 12 perforaciones de 5 μ l cada una. Como puede apreciarse, la alta concentración de IgG sérica en la rata adulta, no puede determinarse con precisión cuando se siembra el suero puro, ya que el tamaño del halo hace dificultosa la medición. Por eso se repitió la experiencia diluyendo el suero 1/5 en SF para obtener un halo medible. En cambio los sueros provenientes de ratas desde las 6 hs de vida hasta los 5 días se sembraron sin diluir ya que la concentración de IgG sérica resultó menor y los halos formados pudieron ser medidos sin dificultad.

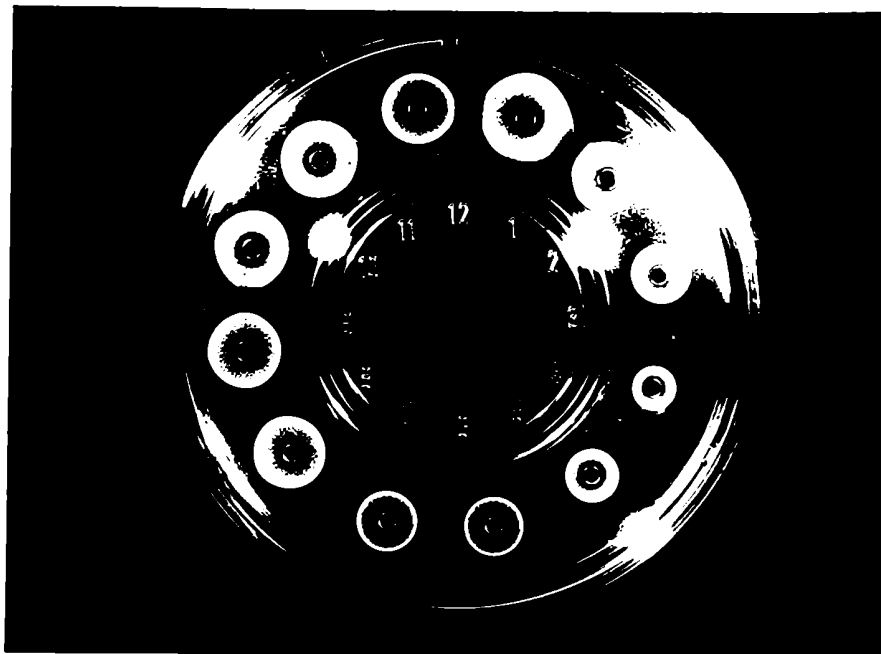
En la Foto N°9 se observa la IDR obtenida cuando se sembraron distintas concentraciones de IgG de origen comercial con fines comparativos y sueros de ratas Wistar de distintas edades. Resultó difícil interpretar la presencia de 2 halos concéntricos cuando se sembró la solución comercial de IgG. Sin embargo el suero de conejo anti-IgG preparado en el laboratorio inoculando los conejos con la solución de IgG purificada también en el laboratorio muestra en la IDR un único y neto halo (Foto N°8). Por ello se utilizó la anti-IgG preparada en el laboratorio para la confección de la curva de

Foto N° 8: Inmunodifusión radial de sueros de ratas Wistar de distintas edades para determinar la concentración de IgG sérica según una curva de calibración.



- | | | |
|--|---|----------------------|
| 1: 45 μ grs de IgG | } | CURVA DE CALIBRACION |
| 2: 30 μ grs de IgG | | |
| 3: 15 μ grs de IgG | | |
| 4: suero de rata Wistar de 3 meses de vida | | |
| 5: suero de rata Wistar de 3 meses de vida diluído 1/5 | | |
| 6: suero de rata Wistar de 6 hs de vida | | |
| 7: " " " " " 18 " " " | | |
| 8: " " " " " 1 día de vida | | |
| 9: " " " " " 2 días de vida | | |
| 10: " " " " " 3 " " " | | |
| 11: " " " " " 4 " " " | | |
| 12: " " " " " 5 " " " | | |

Foto N° 9: Inmunodifusión radial de sueros de ratas Wistar de distintas edades para determinar la concentración de IgG sérica según una curva de calibración.



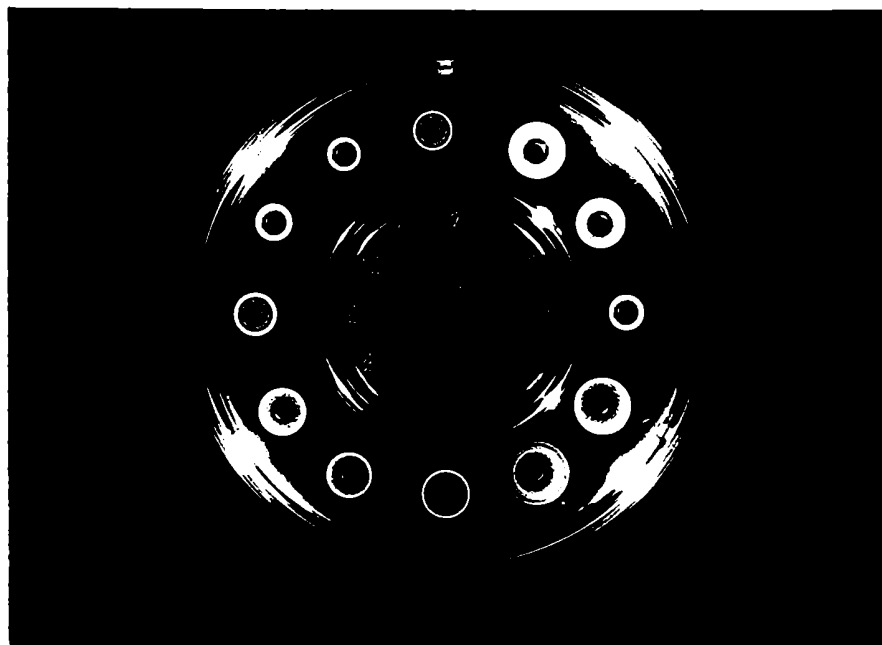
- 1: 50 μ grs de IgG de origen comercial.
- 2: 30 μ grs " " " " " " .
- 3: 20 μ grs " " " " " " .
- 4: 10 μ grs " " " " " " .
- 5: suero de rata Wistar de 6 días de vida.
- 6: " " " " " 7 " " " .
- 7: " " " " " 8 " " " .
- 8: " " " " " 9 " " " .
- 9: " " " " " 10 " " " .
- 10: " " " " " 11 " " " .
- 11: " " " " " 12 " " " .
- 12: " " " " " 13 " " " .

calibración. Puede observarse además que la concentración de IgG sérica va aumentando con la edad de las ratas lo que surge del progresivo aumento del diámetro de los halos.

La Foto N°10 presenta los resultados obtenidos en la IDR utilizando sueros de ratas de 14 a 40 días de vida. Puede observarse que dos de los sueros sembrados en este caso presentaban halos concéntricos (N°5 y 12) cuya aparición no pudo ser explicada ya que es difícil aceptar que se trate de distintas subclases de IgG que aparezcan solo en uno (N°5) de tres diluciones iguales de sueros de ratas de la misma edad (N°4, 5 y 6). Esta foto muestra también que los sueros provenientes de ratas de 15 días de vida y los correspondientes a 20, 30 y 35 días de vida presentan una paulatina disminución del tamaño del halo lo que parecería indicar una disminución en la concentración de IgG sérica.

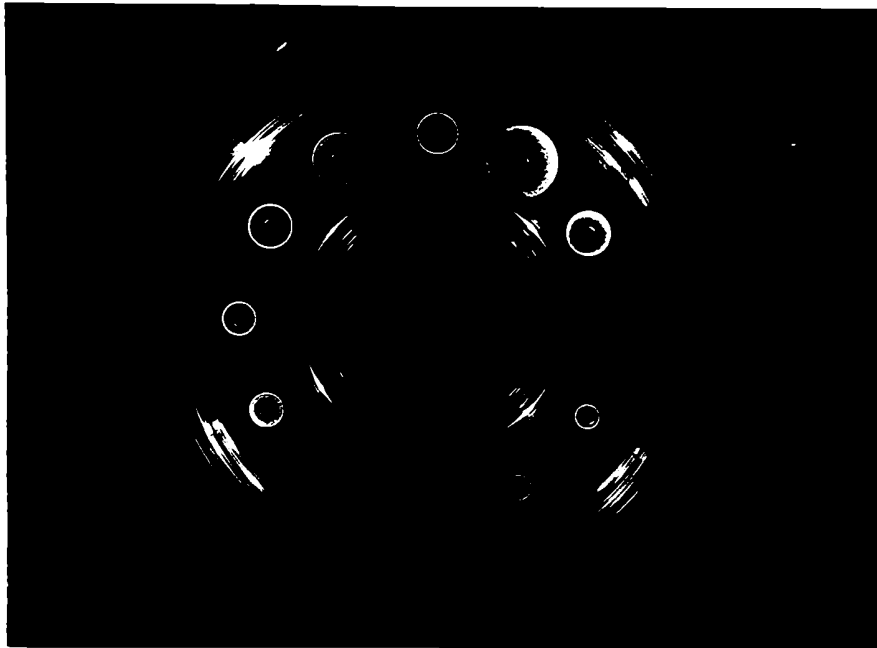
La Foto N°11 muestra aumento en la concentración de IgG sérica en las muestras correspondientes a ratas de 50, 60 y 75 días de vida acercándose a los valores de los animales de 3 meses tomados como control. En esta placa se incluyeron también sueros de ratas Buffalo/Sim de varias edades para comparar los valores con los que habían sido obtenidos en ratas Wistar. Los resultados demuestran que, con ligeras variantes la tendencia observada para la cepa Wistar en cuanto a la concentración sérica de IgG es similar a la de la Buffalo/Sim.

Foto N° 10: Immunodifusión radial de sueros de ratas Wistar de distintas edades para determinar la concentración de IgG sérica según una curva de calibración.



- | | | | | | |
|-----|--|-----------|----|------|---------------------------|
| 1: | 45 | μ grs | de | IgG. | } Curva de
calibración |
| 2: | 30 | μ grs | de | IgG. | |
| 3: | 15 | μ grs | de | IgG. | |
| 4: | Suero de rata Wistar de 3 meses de vida diluído 1/3. | | | | |
| 5: | " | " | " | " | " " " " " " " " |
| 6: | " | " | " | " | " " " " " " " " |
| 7: | " | " | " | " | " 14 días " " " 1/2. |
| 8: | " | " | " | " | " 15 " " " " " |
| 9: | " | " | " | " | " 20 " " " " " |
| 10: | " | " | " | " | " 30 " " " " " |
| 11: | " | " | " | " | " 35 " " " " " |
| 12: | " | " | " | " | " 40 " " " " " |

Foto N° 11: Immunodifusión radial de sueros de ratas Wistar y Buffalo/Sim de distintas edades para determinar la concentración de IgG sérica.



- 1: Suero de rata Wistar de 50 días de vida diluído 1/2.
- 2: " " " " " 60 " " " " 1/3.
- 3: " " " " " 75 " " " " " .
- 4: Suero de ratas Buffalo/Sim de 18 hs de vida.
- 5: " " " " " 1 día de vida.
- 6: " " " " " 2 " " " .
- 7: " " " " " 3 " " " .
- 8: " " " " " 4 " " " .
- 9: " " " " " 6 " " " .
- 10: " " " " " 8 " " " .
- 11: " " " " " 10 " " " .
- 12: " " " " " 3 meses de vida diluído 1/3.

En la Figura N°6 se resumen los resultados obtenidos por IDR graficando los valores absolutos de IgG sérica en mgr/ml en suero de ratas Wistar de distintas edades, calculados en base a la curva de calibración confeccionada.

4.1.4. Nivel del complemento sérico

Ratas Wistar de 2, 5, 8, 10, 13, 19, 25, 32, 50 y 90 días de vida fueron sangradas para determinar el nivel de complemento sérico siguiendo la metodología descrita en el punto 3.4.5. En la Figura N°7 puede observarse la variación de dichos niveles con la edad de los animales. Cada barra representa un promedio de por lo menos tres valores individuales para las ratas de 90, 50, 32, 25 y 19 días de vida, tres pooles de 2 animales para los grupos etarios de 13, 10 y 8 días y tres pooles de 4 animales para las ratas de 5 y 2 días de vida. Como puede observarse con la metodología utilizada, no pudo detectarse complemento en las muestras obtenidas a partir de las ratas de 2 días de vida. Hasta los 8 días los niveles son bajos ($1/4$ - $1/8$), y van aumentando acercándose a los valores hallados en el animal adulto de tres meses de vida los cuales alcanzaron un título promedio de $1/256$.

4.2. MADURACION DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL

4.2.1. Antígenos particulados (GRC)

El primer ensayo fue realizado con el objeto de conocer la

Figura N° 6: Concentración de IgG sérica en ratas de distintas edades.

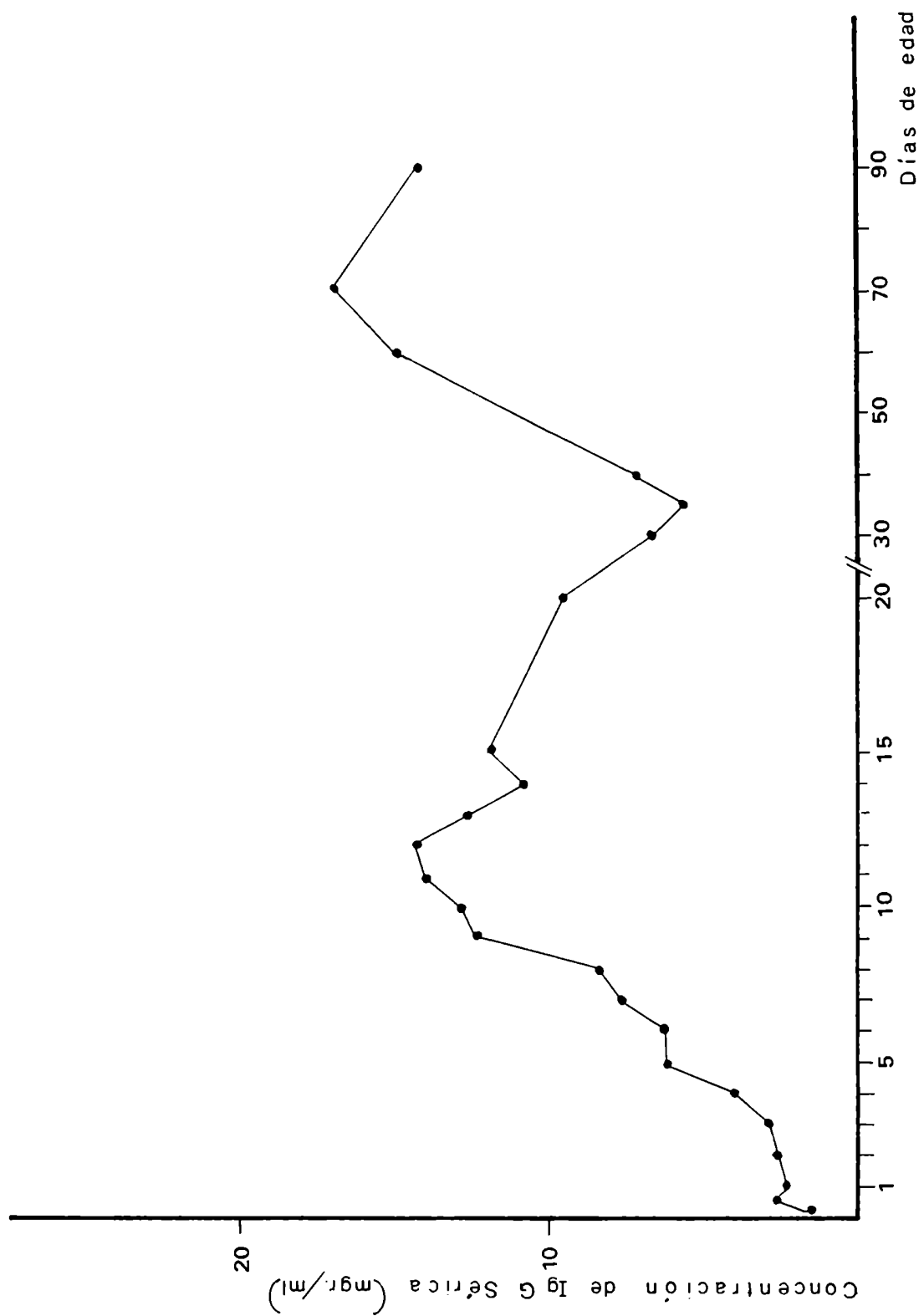
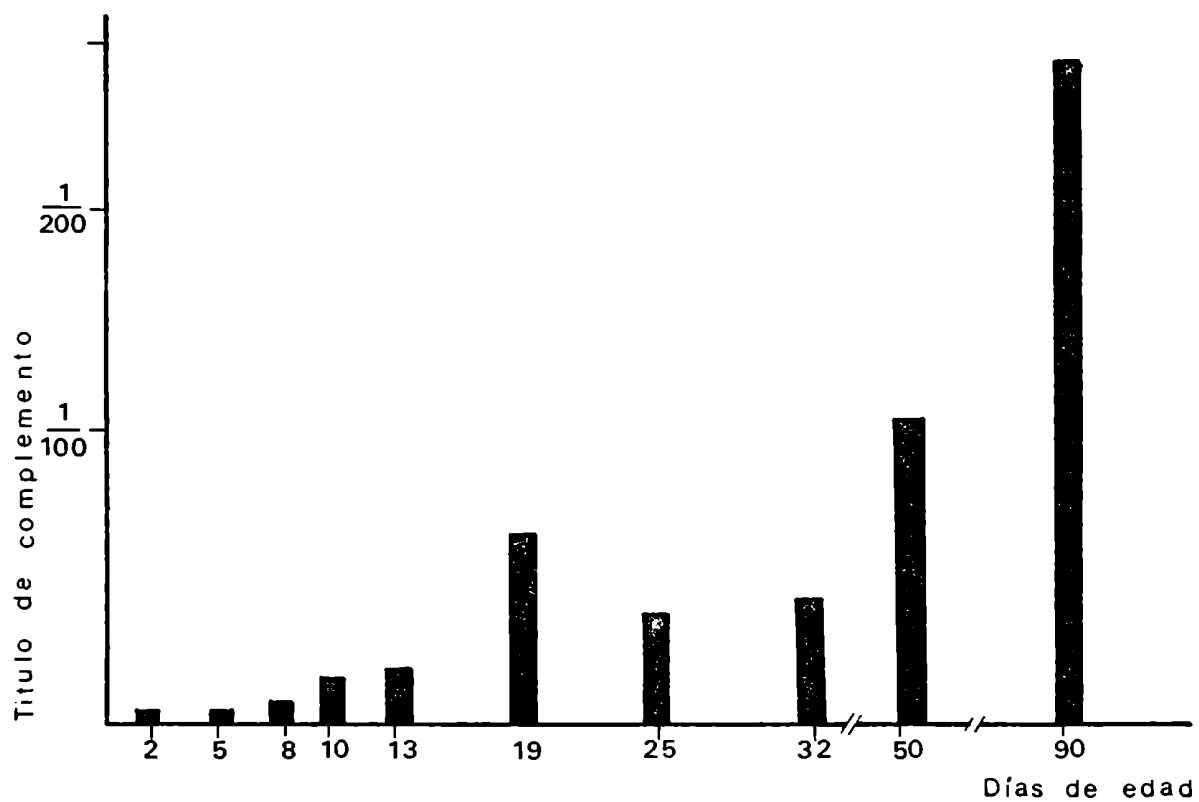


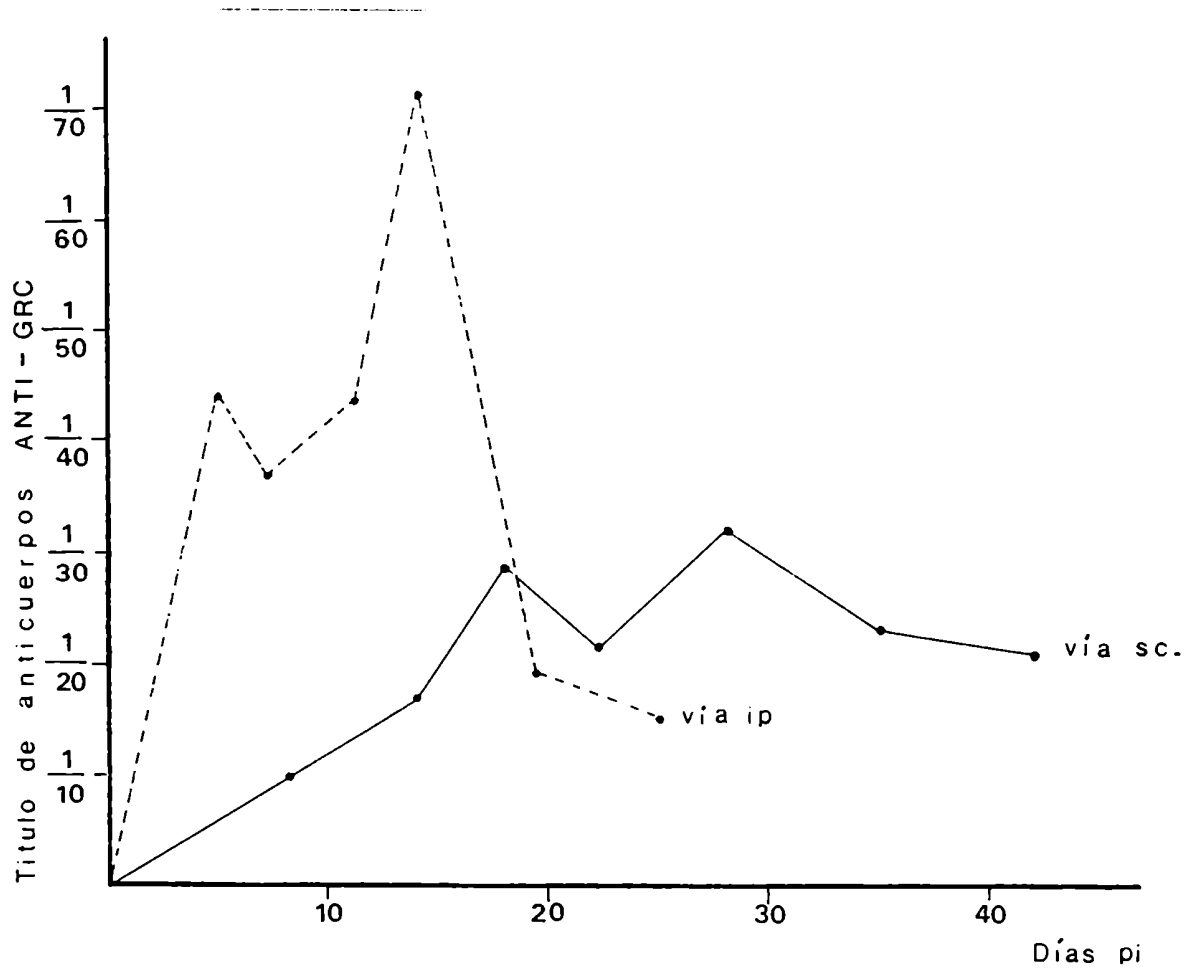
Figura N° 7: Título de Complemento sérico en ratas Wistar. Variación con la edad.



capacidad de la rata adulta de formar anticuerpos hacia este Ag para establecer las condiciones a ser empleadas en animales de distintas edades. El diseño experimental utilizado se describió en el esquema I de Materiales y Métodos. La Figura N°8 representa la cinética de formación de Ac de ratas Wistar de 3 meses de vida inoculadas con 10^9 GRC, a) por vía ip y b) por vía sc. Como puede observarse se obtuvo mayor nivel de Ac séricos circulantes cuando los animales fueron inoculados por vía ip pero estos niveles descienden a partir del día 14 pi; la respuesta fue menor pero más estable cuando el Ag fue inoculado por vía sc. No se detectó la presencia de Ac anti-GRC circulantes en el suero de ratas adultas normales sin estimulación antigénica. En base a estos resultados se eligieron los días 7 y 14 pi para valorar en ellos la respuesta inmune a GRC en ratas de distintas edades ya que en ambos tiempos se obtuvo un nivel detectable de Ac en el adulto por las dos vías utilizadas. Además es un momento suficientemente temprano de la respuesta como para detectar Ac de la clase IgM, que es la primera inmunoglobulina sintetizada tanto en la cinética de la respuesta inmune como en la ontogénica.

Se estudió la maduración de la competencia inmunológica de la rata hacia este Ag particulado, empleando animales de distinguidas edades, los que fueron inoculados con GRC como se descri

Figura N° 8: Cinética de formación de Ac anti-GRC en ratas Buffalo/Sim de tres meses de vida inoculadas con 10^9 GRC por vía ip o sc.



bió en el esquema II de Materiales y Métodos. En la Tabla I se observan los resultados obtenidos después de una inoculación de 10^9 GRC por vía ip. El denominador de cada una de las fracciones representa el número total de animales utilizados para cada grupo etario y el numerador los que respondieron a la inoculación del Ag. Los números que figuran entre paréntesis expresan, para cada edad, el promedio de los títulos de Ac obtenidos calculado sobre la base de los valores positivos. Como puede observarse comienzan a detectarse Ac séricos, si bien en títulos bajos, en las ratas inoculadas a partir de los 6 días de vida. Es interesante destacar que en la mayoría de los casos, se detectó mejor respuesta inmune al día 7 pi ya sea considerando el número total de animales que resultaron positivos así como también el título de Ac séricos obtenido.

Para determinar la influencia de la vía de inoculación se realizó un estudio similar utilizando en este caso la ruta sc. En la Tabla II se muestran los resultados obtenidos en ratas de distintas edades después de la inoculación de 10^9 GRC. En este caso la respuesta fue detectable a partir de los 12 días de vida y con una mínima diferencia a favor del día 14 con respecto al 7 pi. Estos resultados parecerían indicar que, en este sistema la vía ip es mejor inductora de la respuesta humoral que la sc. Es de hacer notar que en el animal adulto el nivel de Ac alcanzado fue también mayor cuando el Ag fue inoculado por vía ip

TABLA I: Título de anticuerpos séricos anti-GRC en ratas Buffalo/Sim de distintas edades inoculadas con 10^9 GRC por vía ip.

Edad en días Días pi											
	2	3	4	5	6	7	8	10	12	16	
7	0/5	0/4	0/4	0/5	1/4(1/8)	2/4(1/4)	3/6(1/5)	3/6(1/4)	4/5(1/16)	5/5(1/30)	
14	0/5	0/5	0/4	0/5	0/4	1/4(1/16)	1/5(1/2)	2/3(1/2)	5/5(1/6)	5/5(1/7)	

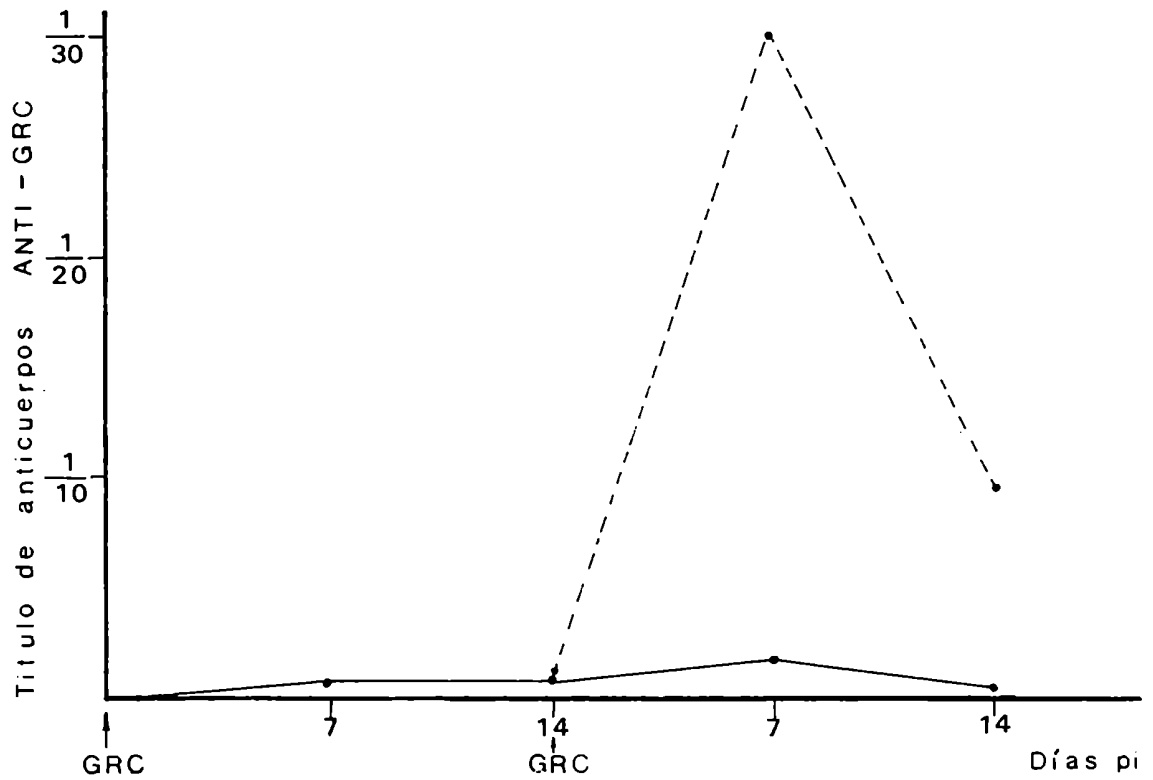
(Figura N°8).

Tabla II: Título de anticuerpos séricos anti-GRC en ratas Buffalo/Sim de distintas edades inoculadas con 10^9 GRC por vía sc.

Edad en días Días pi	2	8	10	12	16
7	0/4	0/8	0/4	1/5 (1/2)	4/4 (1/16)
14	0/4	0/7	0/5	5/5 (1/4)	4/4 (1/20)

Ante la posibilidad que la carencia de respuesta inmune hacia GRC observada en la rata, cuando es inoculada durante los primeros días de vida, no fuese debida a una inmadurez del aparato inmunocompetente sino a la creación de un estado de tolerancia se empleó en otro grupo experimental el esquema III descrito en Materiales y Métodos. La Figura N°9 muestra los niveles de Ac séricos alcanzados cuando las ratas recibieron dos inoculaciones de 10^9 GRC por vía ip, la primera a los 2 y la segunda a los 16 días de vida. Como puede observarse hubo una evidente inhibición en la formación de Ac a la segunda dosis si se la compara con la respuesta primaria del grupo control que recibe una sola dosis a los 16

Figura N°9: Efecto de la inoculación temprana de GRC sobre la respuesta hacia una segunda dosis antigénica a los 16 días de vida.



—●— GRUPO EXPERIMENTAL: Ratas Buffalo/Sim inoculadas a los 2 y 16 días de vida con 10^9 GRC por vía ip.

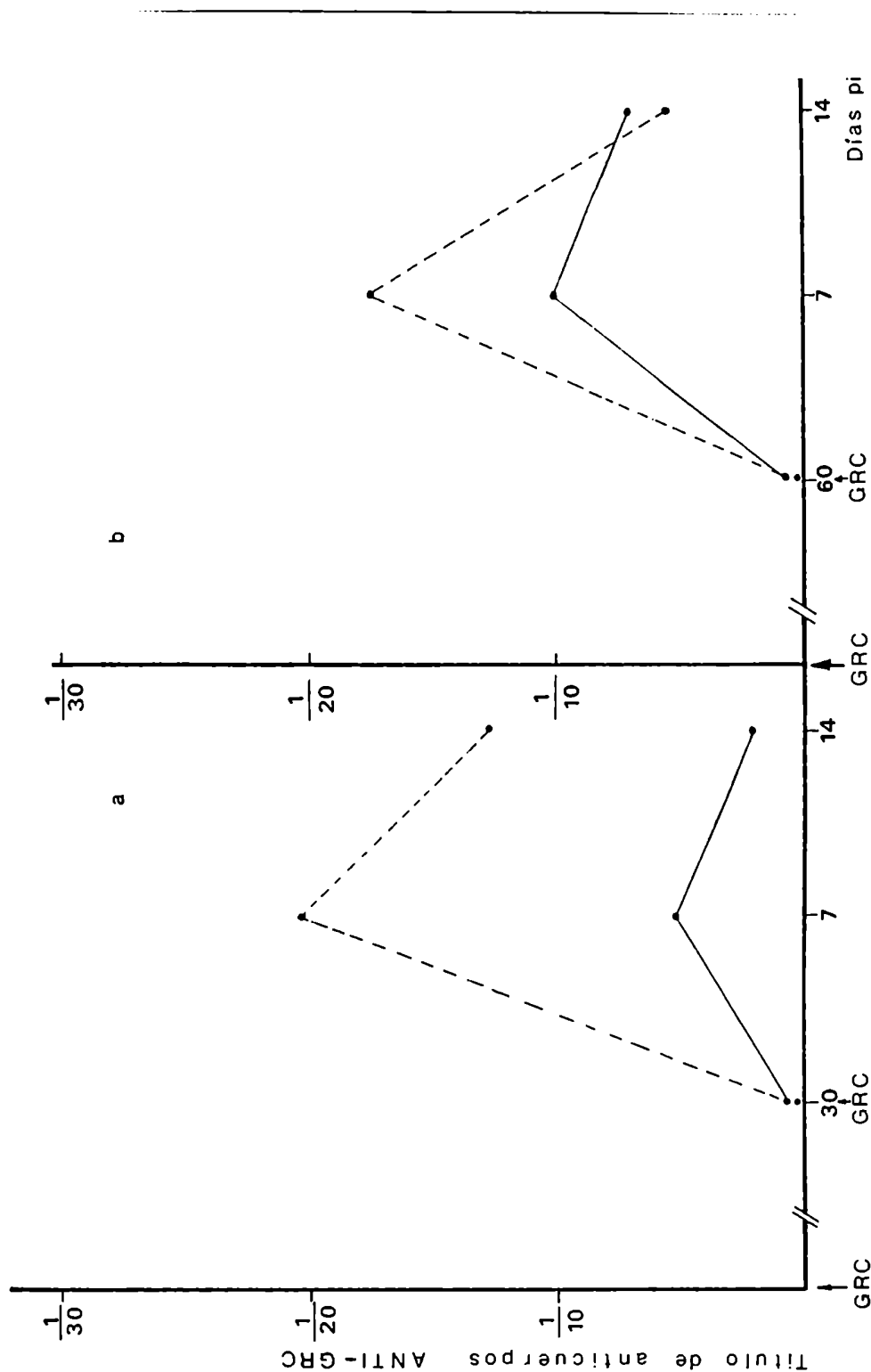
- - -●- - GRUPO CONTROL: Ratas que recibieron una sola dosis a los 16 días de vida.

días de vida. Esta inhibición también se manifestó, aunque en menor grado, cuando las ratas recibieron la segunda inoculación de GRC a los 30 o 60 días de vida. (Figura N°10 a y b).

Para determinar si la dosis de GRC podía modificar el desarrollo de la respuesta se siguió el mismo esquema experimental pero empleando ya sea 10^5 ó 10^7 GRC administrados por vía ip. En la Figura N°11 a y b están representados los resultados obtenidos en ambos casos. No se obtuvo respuesta con 10^5 GRC ni en el grupo experimental (2 inoculaciones) ni en el grupo control, siendo por lo tanto esta cantidad de Ag, en nuestro modelo, insuficiente como para inducir el desarrollo de Ac séricos. En cambio, cuando se empleó 10^7 GRC, se detectaron Ac circulantes, aunque en títulos inferiores a aquellos logrados con 10^9 GRC, solo después de la segunda inoculación en el grupo experimental encontrándose además una leve diferencia en los títulos de Ac alcanzados con respecto al grupo control.

Para determinar la influencia de la vía de penetración del Ag, se empleó también el mismo esquema, utilizando 10^9 GRC como dosis antigénica administrada por vía sc. Los resultados están expresados en la Figura N°12. En este caso tampoco se detectaron Ac circulantes después de la primera inoculación del Ag y alcanzaron bajos niveles después de la segunda, comparando con el grupo control que sólo recibió GRC a los 16 días de vida.

Figura N° 10: Efecto de la inoculación temprana de GRC sobre la respuesta hacia una segunda dosis antigénica a los 30 (a) o 60 (b) días de vida.

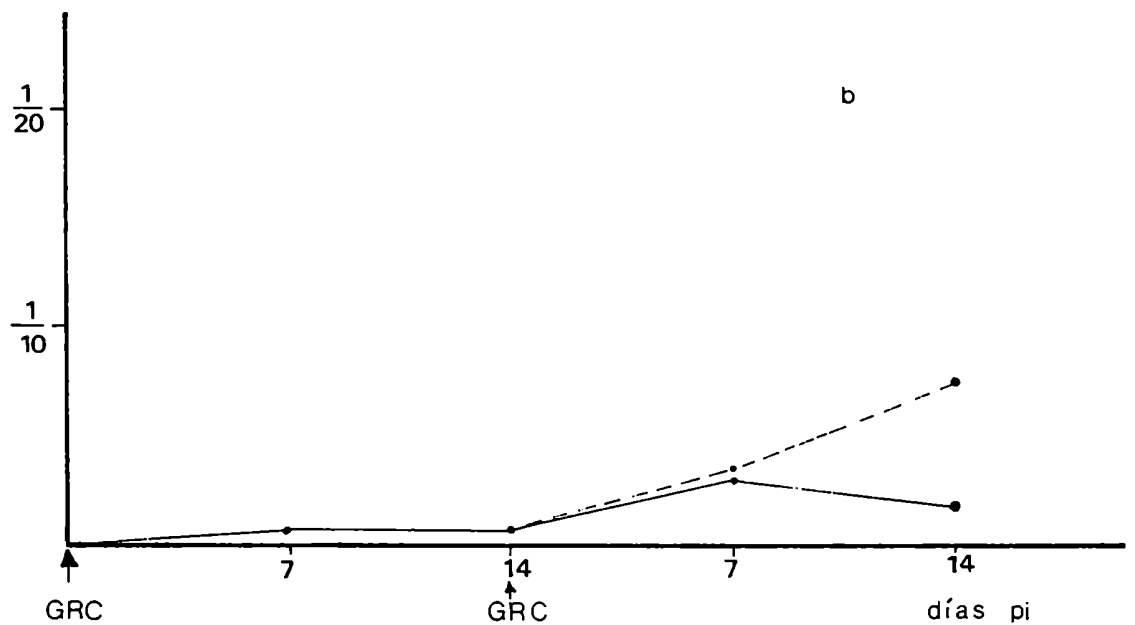
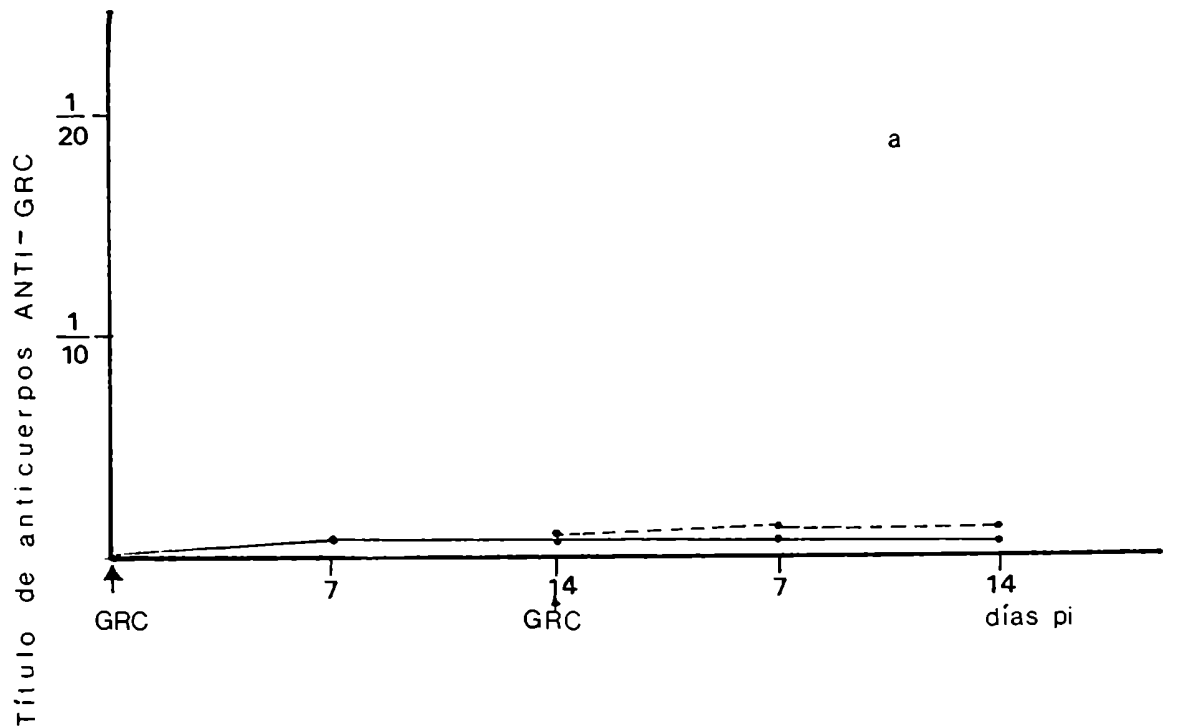


—•— GRUPO EXPERIMENTAL: Ratas Buffalo/Sim inoculadas con dos dosis de 10^9 GRC por vía ip a los 2 días y a los 30 o 60 días de vida.

-•- GRUPO CONTROL: Ratas que recibieron una sola dosis del antígeno a los 30 o 60 días de vida.

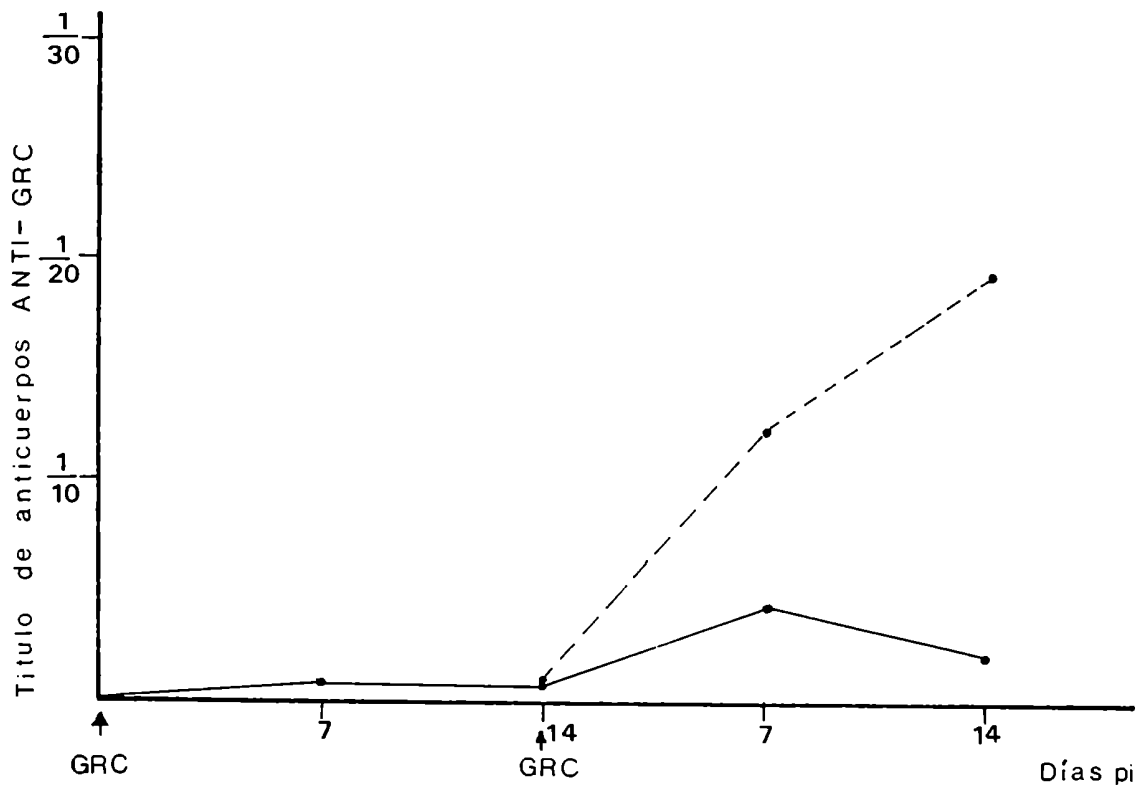
Figura N° 11: Efecto de la dosis antigénica en el desarrollo de la respuesta hacia GRC en ratas neonatales.

a) 10^5 GRC por vía ip b) 10^7 GRC por vía ip.



- GRUPO EXPERIMENTAL: Ratas Buffalo/Sim inoculadas con dos dosis de GRC a los 2 y 16 días de vida.
- - -•- - - GRUPO CONTROL: Ratas que recibieron una sola dosis del antígeno a los 16 días de vida.

Figura N° 12: Efecto de la vía de penetración del antígeno sobre el desarrollo de la respuesta hacia GRC en ratas neonatales.

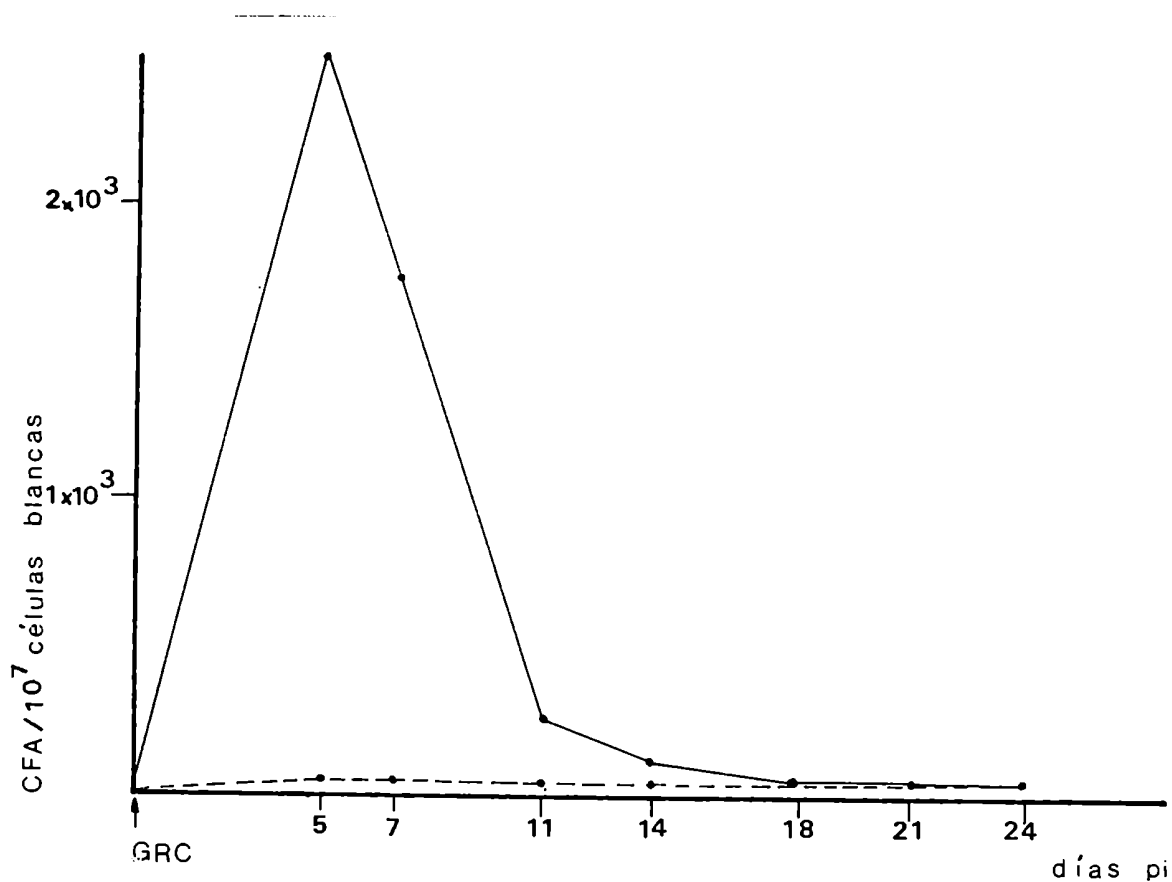


- GRUPO EXPERIMENTAL: Ratas Buffalo/Sim inoculadas con dos dosis de 10^9 GRC por vía sc a los 2 y 16 días de vida.
- - -●- - - GRUPO CONTROL: Ratas que recibieron una sola dosis del antígeno a los 16 días de vida.

Con el objeto de analizar este problema de manera más detallada se decidió emplear una técnica más sensible que permitiese valorar la formación de Ac a nivel celular. Para ello se utilizó la técnica de Cunningham con la que se cuantificaron las células esplénicas formadoras de Ac. La Figura N°13 muestra los valores de CFA obtenidos luego de la inoculación de 10^9 GRC en ratas adultas y de 2 días de vida siguiendo el esquema IV descrito en Materiales y Métodos. Cada punto representa la media de 4 animales adultos y de 4 lactantes según el caso. Como puede observarse, en el animal adulto el máximo de la respuesta corresponde al día 5 pi (placas directas) con una media de $2659 \text{ CFA}/10^7$ células blancas, valor que va descendiendo hasta hacerse indetectable el día 18 pi. A lo largo del experimento, los valores obtenidos en los animales de 2 días de vida, no sobrepasaron las $60 \text{ CFA}/10^7$ células esplénicas. Estas experiencias corroboraron los resultados anteriores, estudiando los Ac séricos, ya que vuelve a demostrarse que la rata de dos días de vida no responde a la inoculación de GRC aún cuando se utilice como en este caso una técnica más sensible que la hemaglutinación.

La Figura N°14 muestra las CFA obtenidas después de utilizar el esquema experimental V ya explicado en Materiales y Métodos. Cada punto representa el promedio de 4 valores individuales. Puede observarse la inhibición de la respuesta a la segunda

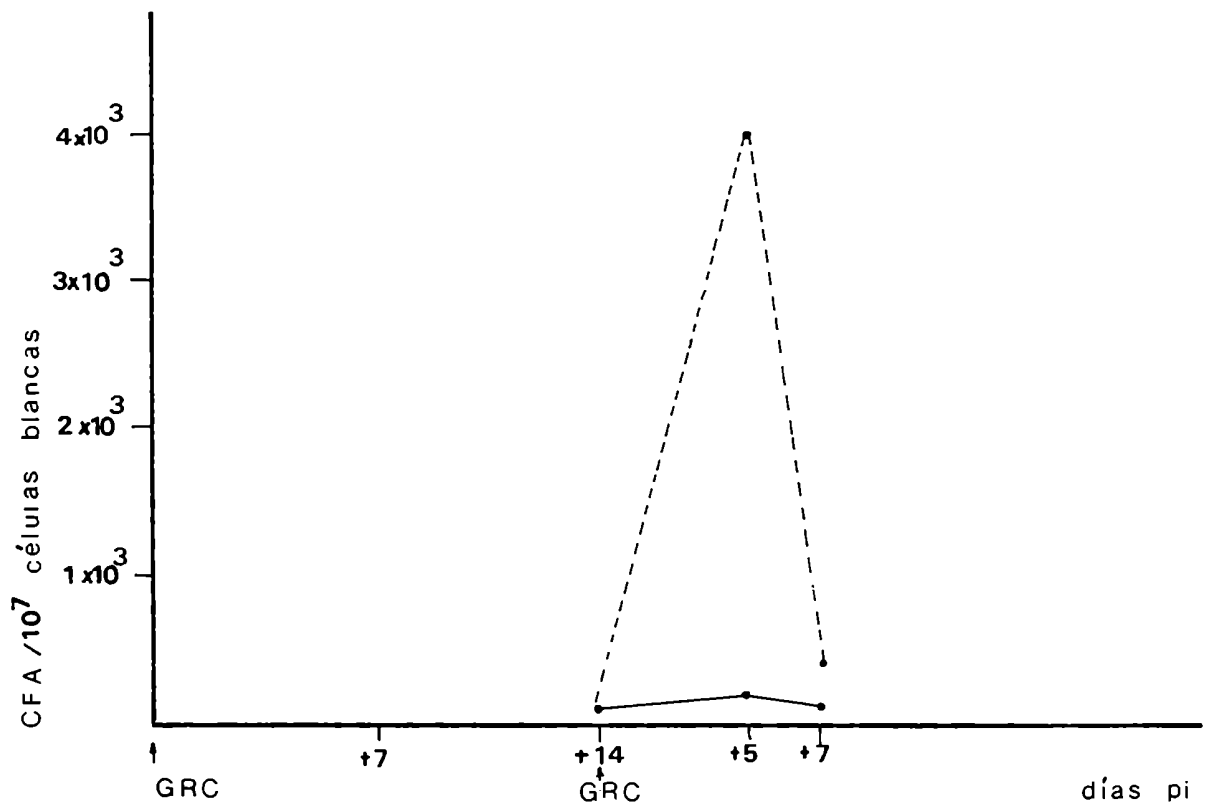
Figura N° 13: Cinética de las CFA esplénicas hacia GRC de ratas Buffalo/Sim adultas y de 2 días de vida inmunizadas con 10^9 GRC por vía ip.



●—● Ratas adultas.

●- - -● Ratas de 2 días de vida.

Figura N° 14: CFA esplénicas obtenidas luego de dos inoculaciones de 10^9 GRC por vía ip a los 2 y 16 días de vida.



- GRUPO EXPERIMENTAL: Ratas Buffalo/Sim que recibieron dos inoculaciones de GRC.
-• GRUPO CONTROL: Ratas Buffalo/Sim que solo recibieron una inoculación de GRC a los 16 días de vida.

inoculación del antígeno, en las ratas que recibieron una primera dosis anitigénica comparada con la buena respuesta inmune de los controles corroborando así los resultados ya obtenidos por hemaglutinación directa.

4.2.2. Antígenos solubles

4.2.2.1. Albúmina sérica bovina (ASB)

Con el objeto de determinar la dosis de ASB a utilizar en el estudio de la maduración inmunológica de la rata hacia este Ag, se emplearon 2 lotes de ratas Wistar adultas las que se inocularon con 500 ó 5000 μ gr de ASB por vía sc como se describe en el esquema VI de Materiales y Métodos. La Figura N°15 muestra la cinética de formación de Ac obtenida en ambos grupos experimentales. Cada valor representa la media de títulos obtenidos en tres muestras individuales. Como puede observarse, con las dosis empleadas se obtienen curvas similares alcanzándose títulos levemente superiores en el día 53 pi. (1/1700 vs 1/1300) con la dosis de 500 μ gr. Por lo tanto ésta fue elegida para los ensayos tendientes a estudiar la maduración inmunológica de la rata hacia este Ag.

En la Figura N°16 (a,b,c,d) se observa la cinética de formación de Ac en ratas de distintas edades las cuales fueron inoculadas como indica el esquema VII descripto en Materiales y Méto

Figura N° 15: Cinética de formación de Ac anti-ASB en ratas Wistar de tres meses de vida inmunizadas con 500 o 5.000 μ grs del antígeno en ACF por vía ipl.

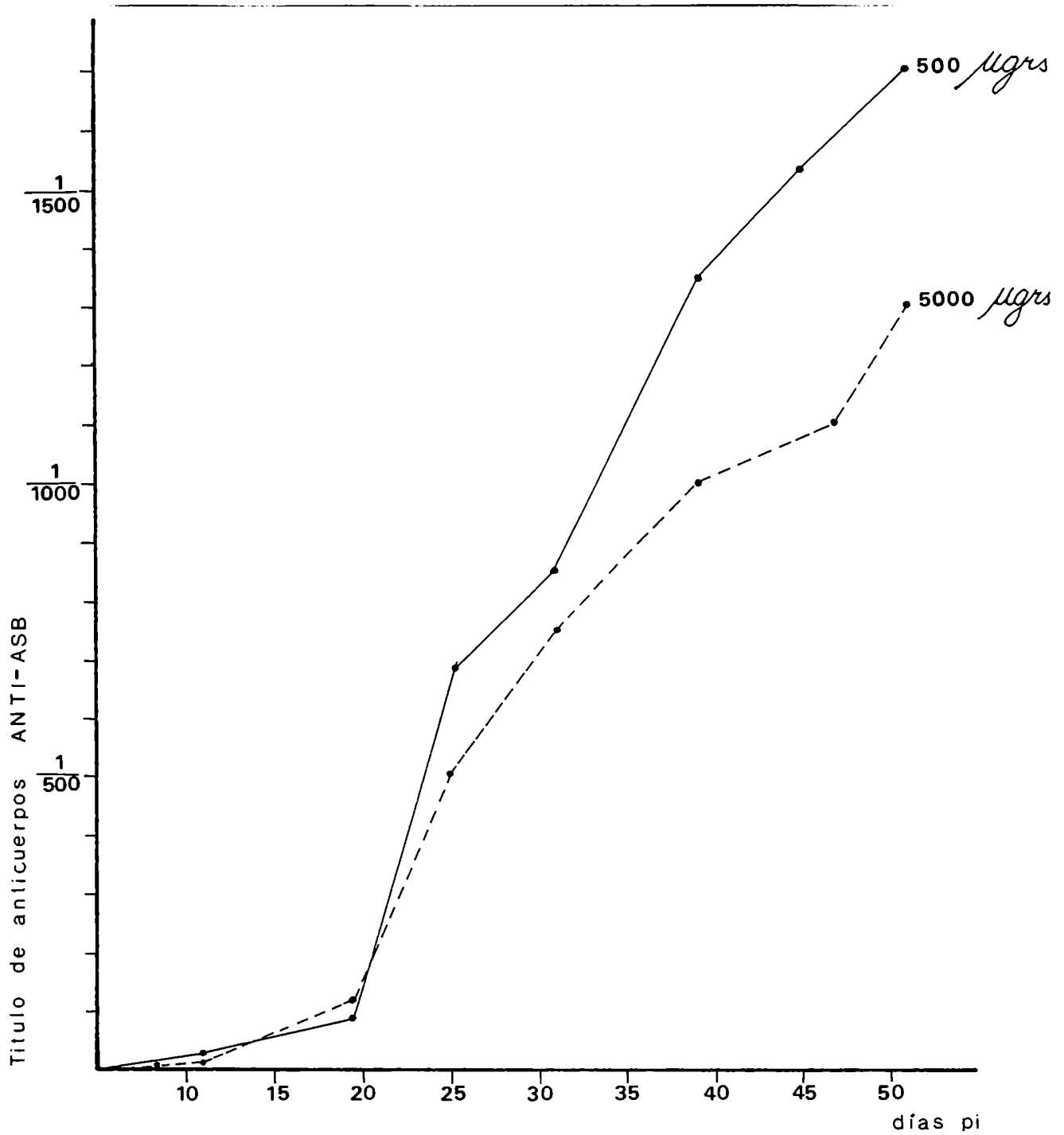
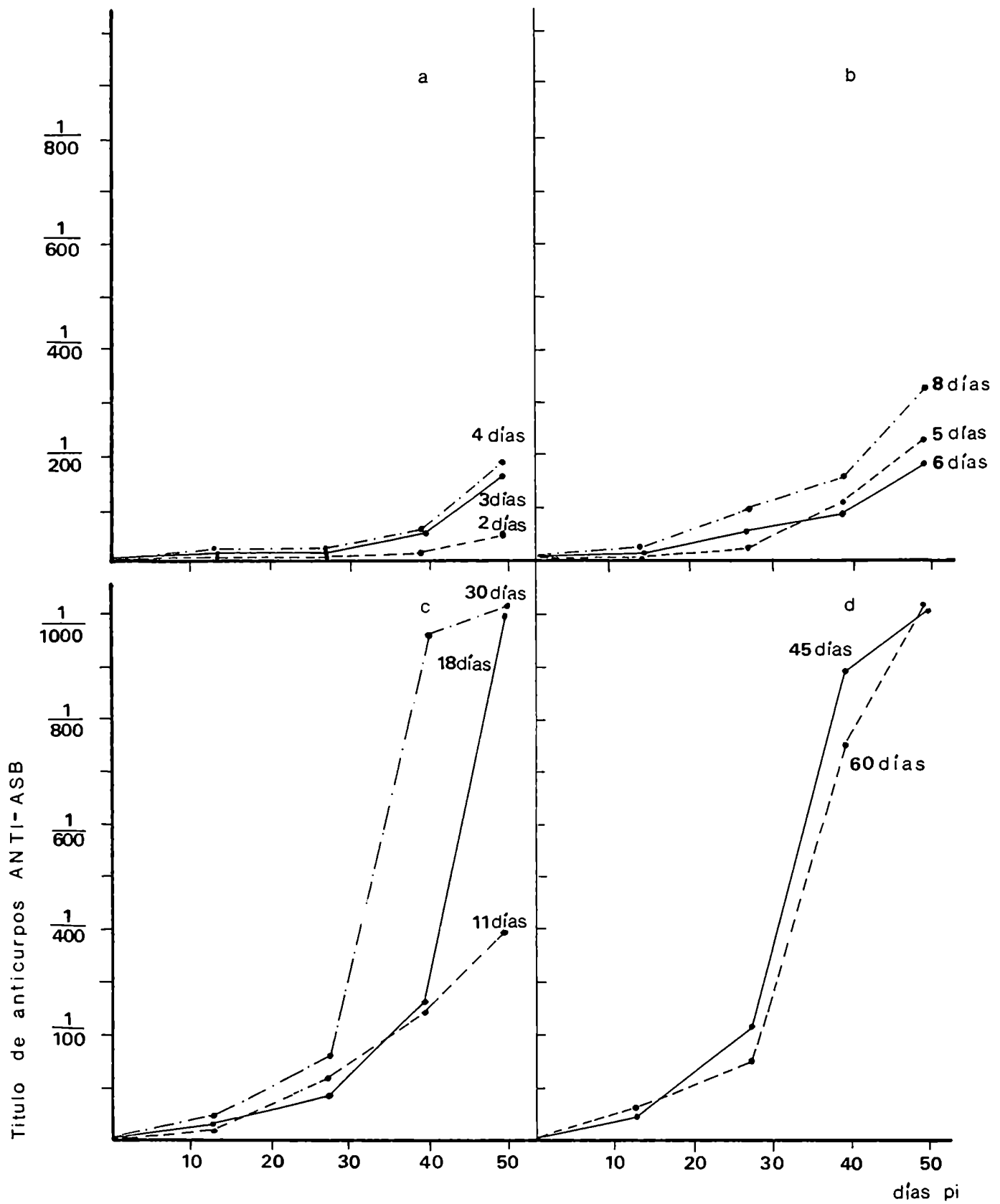


Figura N° 16: Cinética de formación de Ac anti-ASB en ratas Wistar de distintas edades inmunizadas con 500 μ grs del antígeno en ACF por vía ipl.



dos. Para el análisis de los resultados, los valores obtenidos en todos los grupos fueron comparados con los del animal adulto de 3 meses de vida. Como puede observarse en la Figura N°16a, no pudo detectarse Ac en los animales inoculados a los 2 días de vida hasta los 37 días pi (alcanzando títulos de 1/50 el día 49 pi). Los valores fueron aumentando gradualmente en ratas de edades posteriores obteniéndose también en el día 49 pi títulos de 1/160, 1/180, 1/232, 1/185 y 1/330 en animales inoculados a los 3, 4, 5, 6 y 8 días respectivamente (Figura N°16 a y b). Es interesante también destacar que en estos casos la respuesta comienza a ser positiva más tempranamente es decir entre los 20 y 30 días. Un llamativo incremento en el título de Ac se observó en las ratas inoculadas a los 18 días de vida ya que el valor (1/1000 a los 49 días pi) fue aproximadamente tres veces mayor si se lo compara con los inoculados a los 11 días de vida (1/380) (Figura N°16 c). En los grupos de edades posteriores los títulos no variaron significativamente ni entre sí, ni si se los compara con los de los animales de 18 días ya que oscilaron alrededor de 1/1026, 1/1004 y 1/1026 en los animales inoculados a los 30, 45 y 60 días de vida respectivamente (Figura N°16 c y d).

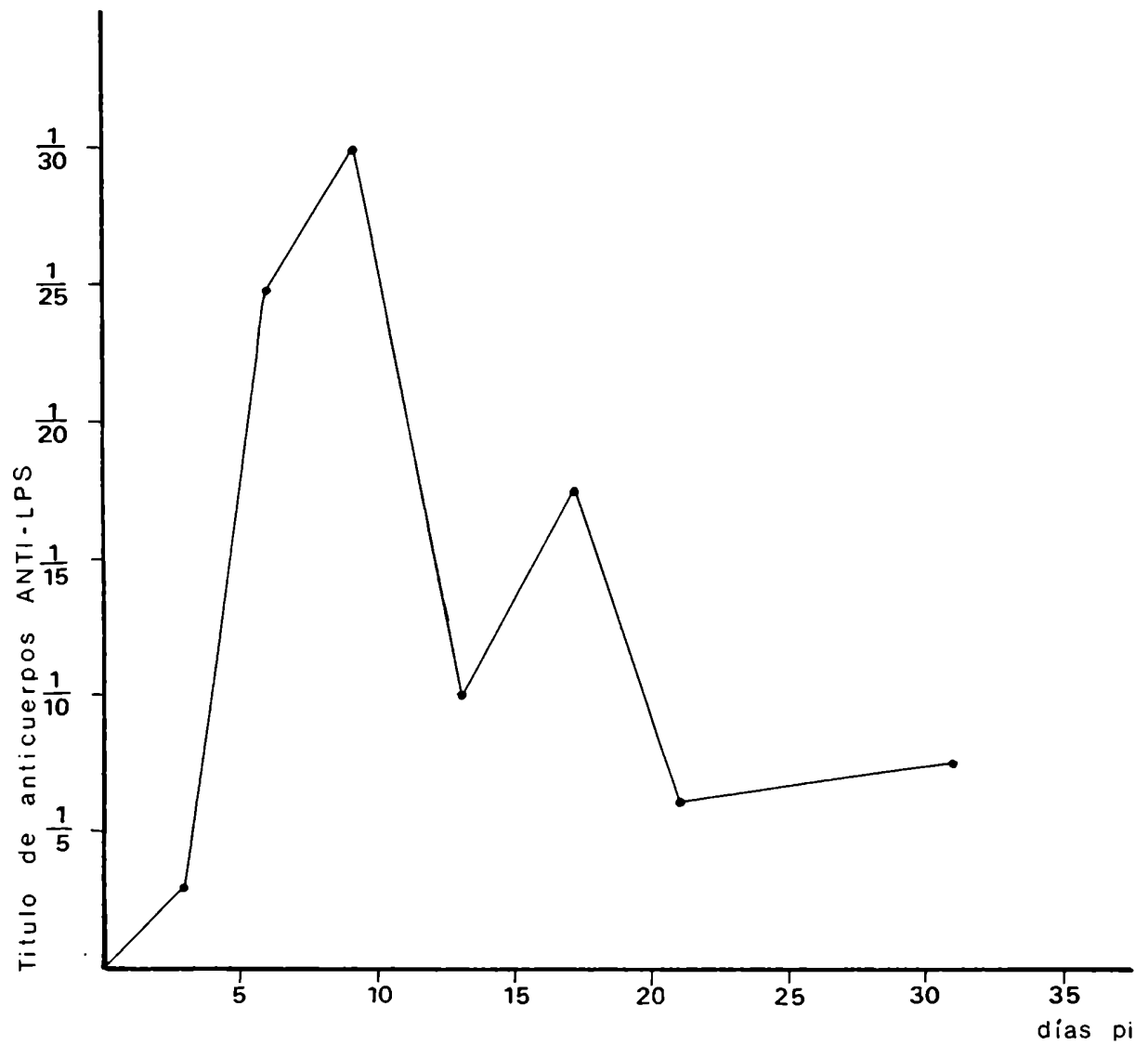
Si se comparan las Figuras N°15 y 16 puede observarse que en ninguna de las edades se obtuvo una respuesta de Ac circulantes anti-ASB de la magnitud encontrada en el animal adulto.

4.2.2.2. Lipopolisacárido (LPS)

La Figura N°17 muestra la cinética de formación de Ac séricos anti-LPS obtenida en ratas Wistar de 3 meses de vida inoculadas con 10 μ gr de LPS como se describe en Materiales y Métodos. Cada punto representa el valor medio entre 4 a 5 muestras individuales. Puede observarse una respuesta de tipo oscilatorio presentando un pico máximo de Ac (1/30) el día 9 pi y otro pico menor (1/18) el día 17 pi. Como control, ratas adultas sin estimulación antigénica fueron sangradas para valorar la presencia de Ac séricos naturales ya que este Ag es extraído de Escherichia coli, microorganismo que forma parte de la flora normal entérica y podrían eventualmente presentar Ac. Las muestras estudiadas resultaron negativas a excepción de 2 de ellas en las que se valoró 1/2, 1/4.

Con el objeto de valorar el comportamiento inmunológico de ratas de diferentes edades hacia este Ag, animales de 2, 4, 7, 11, 15, 22, 37 y 52 días de vida fueron inoculados con 10 μ grs de LPS como se describió en Materiales y Métodos. En la Tabla III se observan los resultados obtenidos en los grupos 2, 4, 7 y 11 días de vida. El denominador de cada fracción expresa el número total de animales sangrados para cada tiempo y el numerador, la cantidad de muestras que resultaron positivas. El número que figura entre paréntesis indica el valor medio en el título de Ac calcu

Figura N° 17: Cinética de formación de Ac anti-LPS en ratas Wistar de tres meses de vida inmunizadas con 10 μ grs de LPS por vía ip.



lado en base a los resultados positivos.

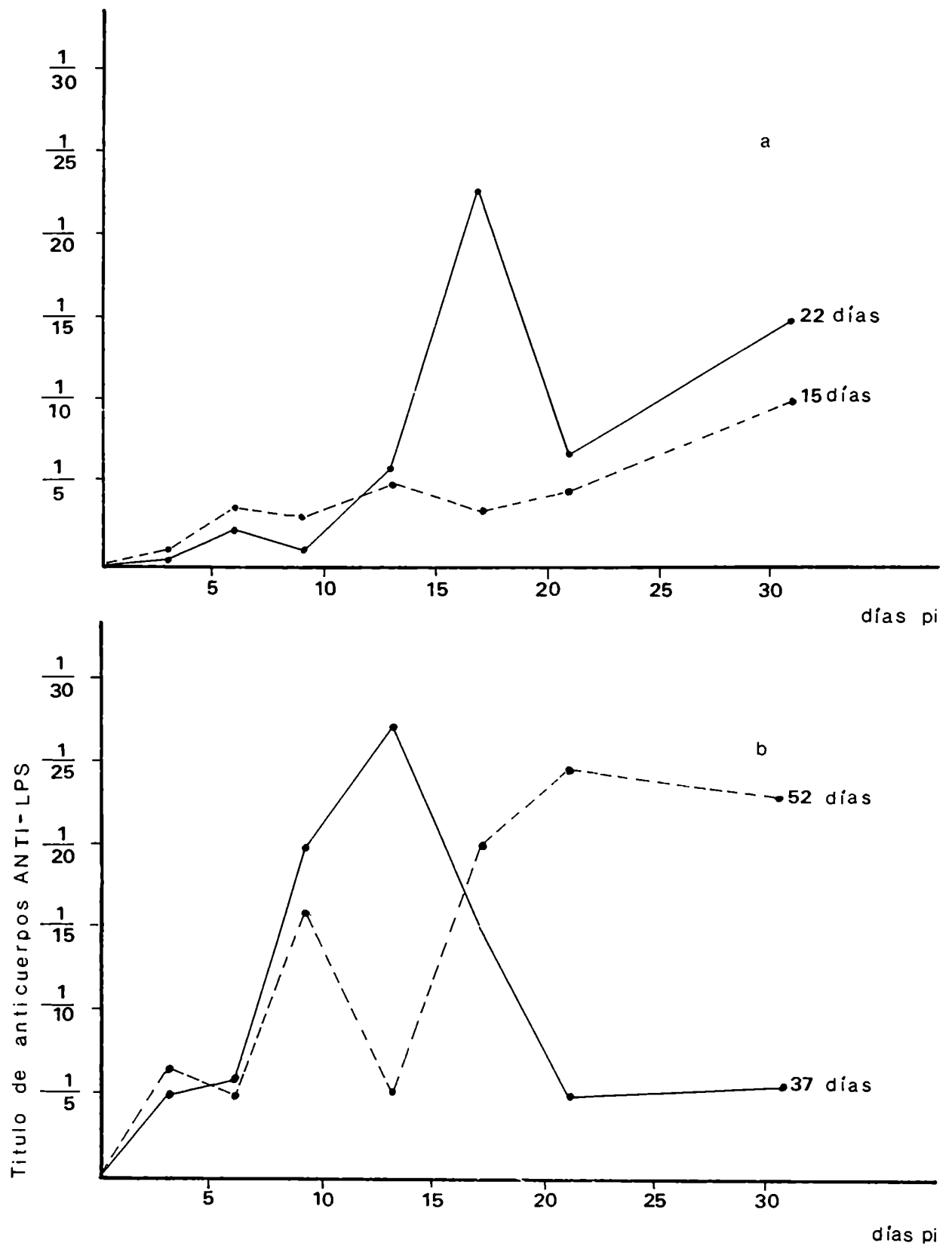
Tabla III: Respuesta humoral anti-LPS en ratas Wistar de distintas edades inmunizadas con 10 μ grs de LPS.

Días pi Edad (días)							
	3	6	9	13	17	21	31
2	0/4	0/4	0/5	0/5	0/4	0/5	0/5
4	0/5	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
7	0/4	1/4 (1/2)	1/5 (1/4)	2/4 (1/4)	2/5 (1/8)	0/5	0/5
11	0/4	0/4	1/4 (1/16)	3/4 (1/5)	0/4	0/4	0/4

No se detectaron Ac séricos en las muestras provenientes de los grupos de 2 y 4 días de vida y en bajos niveles en algunos sueros pertenecientes a los animales de 7 y 11 días de edad, en los días 9, 13 y 17 pi.

La Figura N°18 a y b representa la cinética de formación de Ac de las ratas inoculadas a los 15, 22, 37 y 52 días de vida. Como puede observarse, la capacidad para la formación de Ac séricos aumenta con la edad de los animales alcanzando, aunque más tardíamente (día +13), una magnitud similar a la de la rata adulta a los 37 días de vida. En la mayoría de los casos se obtiene también una respuesta de tipo oscilatorio con un pico de Ac el día 17 pi

Figura N° 18: Cinética de formación de Ac anti-LPS en ratas Wistar de distintas edades inmunizadas con $10 \mu\text{grs}$ de LPS por vía ip.



en los animales inoculados a los 22 días de edad (Figura N°18 a). En la Figura N°18 b puede observarse que ese pico de Ac circulantes aparece más precozmente (día +13 en las ratas inoculadas a los 37 días de vida y día +9 en las inoculadas a los 52 días, acercándose , por lo tanto, a la curva obtenida en las adultas en las cuales, como ya se indicó, aparece a los 9 días pi (Figura N°17).

4.3. MADURACION DE LA RESPUESTA DE HIPERSENSIBILIDAD MEDIADA POR CELULAS:

2,4-Dinitro-1-Fluorbenceno (DNFB)

Ensayos con la Dd

Siguiendo la metodología ya descripta, el primer paso fue determinar en el animal adulto cuál era la Dd que no produjera lesión "per se" y que a su vez resultase útil para desencadenar la reacción. Para ello se probaron 3 dosis (0,1%; 0,3% y 0,5%) en ratas de tres meses de vida que no habían recibido la Ds. La Tabla IV muestra el porcentaje de hinchazón de la oreja medidos a las 24, 48 y 72 hs. después de la Dd; cada valor es el promedio de 3 datos individuales. A pesar de que con la dosis de 0,3% se obtuvo un leve aumento del espesor de la oreja, naturalmente inespecífico, fue la elegida para las experiencias posteriores ya que la de 0.5% produjo lesión cutánea con un aumento significativo en el espesor de la oreja y la dosis menor podría resultar ine-

fectiva para desencadenar la reacción.

Tabla IV: Porcentaje de hinchazón de la oreja en ratas adultas que solo recibieron la Dd*.

Hs post Dd Dosis de DNFB	24	48	72
0,1%	3,41 \pm 1,24	5,8 \pm 1,8	5,7 \pm 3,5
0,3%	2,01 \pm 0,08	6,87 \pm 2,7	4,65 \pm 1,38
0.5%	29,29 \pm 3,5	20,23 \pm 5,45	11,96 \pm 6,73

* $\bar{X} \pm ES$

Para determinar por lo tanto la efectividad de la dosis elegida se ensayó el siguiente esquema utilizando DNFB al 10% como Ds.

	Ds	Dd	24hs	48hs	72hs	GRUPO
DNFB	10%	0,3%	Lectura			EXPERIMENTAL
Día	0	+7	+8	+9	+10	(5 animales)
		Dd	24hs	48hs	72hs	GRUPO
		0,3%	Lectura			CONTROL
						(3 animales)

La Tabla V muestra el porcentaje de hinchazón de la oreja en am
bos grupos,

Tabla V: Porcentaje de hinchazón de la oreja en ratas adultas sensibilizadas
con DNFB al 10% y desencadenadas a los 7 días con DNFB al 0,3%*.

		Lectura		
Grupo	Ds Dd	Horas post Dd		
		24	48	72
Control Dd (3 animales)	- +	11,32 \pm 2,34	8,72 \pm 1,38	6,92 \pm 1,24
Experimental (5 animales)	+ +	33,95 \pm 2,6	26,45 \pm 2,27	22,80 \pm 1,26

* $\bar{X} \pm ES$

Estos resultados indican que la Dd utilizada fue efectiva para desencadenar una reacción de hipersensibilidad retardada ya que se observó un aumento significativo de la reacción entre el grupo control y experimental ($p < 0,0005$).

Como este esquema debía ser utilizado en ratas recién nacidas en las cuales la superficie útil del pabellón de la oreja es pequeño debía previamente ensayarse, también en el animal adulto, la du
ración de la reacción en un período más prolongado entre la Ds y Dd.

Esto permitiría el desarrollo de una superficie del pabellón de la oreja suficiente para visualizar adecuadamente la reacción. Por lo tanto se probó un esquema similar al anterior pero en el cuál la Dd fue aplicada 14 días después de la Ds.

En la Tabla VI se observan los resultados obtenidos:

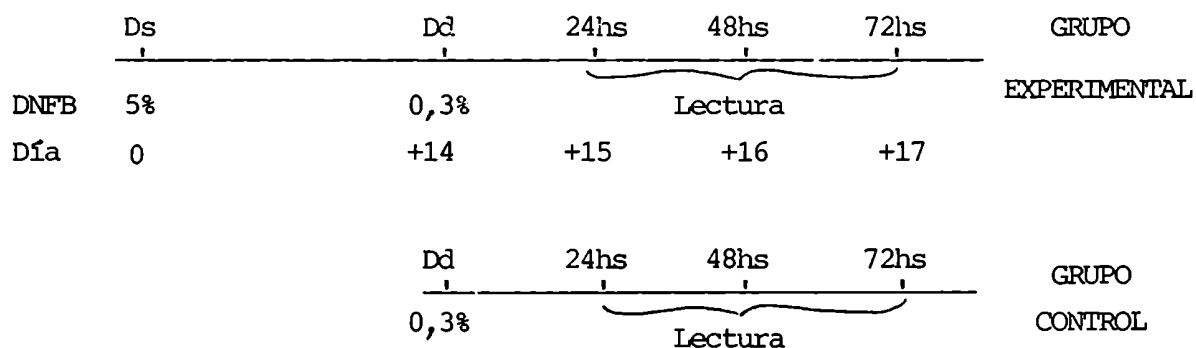
Tabla VI: Porcentaje de hinchazón de la oreja en ratas adultas sensibilizadas con DNFB al 10% y desencadenadas a los 14 días con DNFB al 0,3%

			Lectura		
Grupo	Ds	Dd	Horas post Dd		
			24	48	72
Control (3 animales)	-	+	9,86 ± 2,49	10,69 ± 2,76	7,13 ± 2,07
Experimental (5 animales)	+	+	61,54 ± 13,59	48,25 ± 5,15	17,73 ± 2,47

* $\bar{X} \pm ES$

Como puede apreciarse la HR resultó también positiva y en este caso el porcentaje de hinchazón de la oreja en el grupo experimental fue mayor que en el caso anterior ($p < 0,0005$).

La Ds del 10% de DNFB resultó tóxica para las ratas pequeñas y por lo tanto se ensayó, en el animal adulto la capacidad antigénica del DNFB al 5% según el esquema siguiente:



En la Tabla VII se muestran los porcentajes de hinchazón de la oreja obtenidos con este diseño experimental.

Tabla VII: Porcentaje de hinchazón de la oreja en ratas adultas sensibilizadas con DNFB al 5% y desencadenadas a los 14 días con DNFB al 0,3%*.

Grupo	Ds	Dd	Lectura		
			Horas post Dd		
			24	48	72
Control (3 animales)	-	+	12,13 ± 1,04	9,47 ± 1,81	2,69 ± 1,76
Experimental (5 animales)	+	+	25,19 ± 2,1	21,44 ± 1,75	13,74 ± 2,65

* $\bar{X} \pm ES$

($p < 0,0025$)

Como puede observarse, la Ds utilizada fue suficiente para sensibilizar a los animales obteniéndose una reacción de HR valorable aunque de magnitud inferior a la alcanzada cuando se utilizó la Ds del 10%. Por lo tanto este esquema se eligió para ser utilizado en ratas de distintas edades con el objeto de determinar su capacidad de respuesta.

La Tabla VIII expresa los porcentajes de hinchazón de la oreja que se registraron en los animales de distintas edades. Los valores para cada grupo etario se comparan con los de los animales controles que solo recibieron la Dd. También se incluyeron los porcentajes que figuran en la Tabla VII que corresponden a los de los animales de 3 meses de vida que se utilizaron como patrón de comparación.

Estos resultados indican que los animales sensibilizados a los 8 días de vida son capaces de desarrollar la respuesta inmune y de expresar la reacción de HR al DNFB. Este mismo esquema experimental fue empleado en ratas de 5, 6 y 7 días de vida. No se presentan los valores numéricos ya que las lecturas coincidieron con el período de rápido crecimiento de los animales en el cual las orejas disminuyen su espesor día por día obteniéndose valores negativos con respecto al tiempo 0.

TABLA VIII: Porcentaje de hinchazón de la oreja en ratas adultas, de 8 y 10 días de vida sensibilizadas con DNFB al 5% y desencadenadas a los 14 días con DNFB al 0,3%*

		Lectura		
		Horas después de la Dd		
Edad	Grupo	24	48	72
Adulto	Control	12,13 \pm 1,04	9,47 \pm 1,81	2,69 \pm 1,76
	Experimental	25,19 \pm 2,1	21,44 \pm 1,75	13,74 \pm 2,65
8 días	Control	5,53 \pm 1,79	1,4 \pm 1,37	1,3 \pm 0,71
	Experimental	20,47 \pm 2,02	13,13 \pm 2,86	10,29 \pm 1,16
10 días	Control	7,42 \pm 1,52	3,26 \pm 1,07	3,15 \pm 1,6
	Experimental	21,03 \pm 2,35	15,18 \pm 2,13	8,2 \pm 1,39

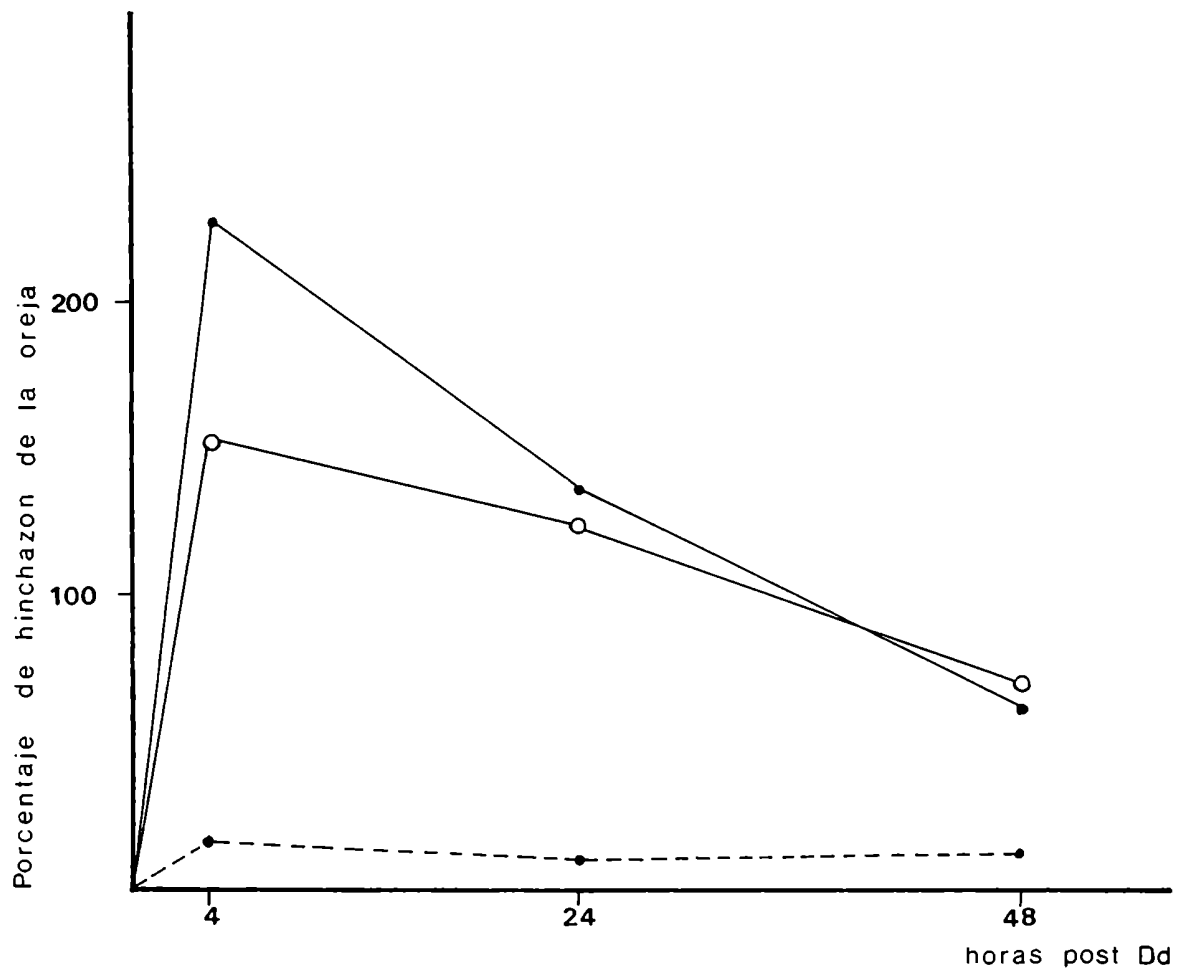
* $\bar{X} \pm ES$

($p < 0,0005$)

4.4. ESTUDIOS DE HIPERSENSIBILIDAD MEDIADA POR ANTICUERPOS

Con el objeto de estudiar la maduración de la capacidad de la rata para desarrollar una reacción de hipersensibilidad mediada por Ac, se realizaron ensayos previos en animales adultos de 3 meses de vida para determinar en ellos la dosis y el esquema experimental a utilizar en el resto de las experiencias. Estos están descriptos en el esquema X de Materiales y Métodos. La Figura N°19 resume los resultados obtenidos utilizando como Ds 500 (a) ó 5.000 (b) μ grs de ASB en ACF por vía intraplantar (ipl). Como Dd se emplearon 50 μ grs de ASB sin ACF inoculada por vía id en el pabellón de la oreja derecha el día 26 pi. Cada punto de la figura representa el promedio entre 6 a 8 valores individuales. Como puede observarse el porcentaje de hinchazón es mayor a las 4 hs de la Dd ($226,84 \pm 5,87$ para la dosis menor y $152,78 \pm 31,71$ para la mayor). Estos valores van disminuyendo a medida que transcurren las horas ($138,57 \pm 12,96$ y $66,87 \pm 3,22$ a las 24 y 48 hs respectivamente en los animales inoculados con 500 μ grs de ASB; $125,55 \pm 33,26$ y $71,97 \pm 33,09$ para las 24 y 48 hs respectivamente en los animales inoculados con 5.000 μ grs del Ag). Macroscópicamente se observa un intenso eritema que también es máximo a las 4 hs y va disminuyendo paulatinamente a las 24 y 48 hs post Dd. El grupo de 4 animales que sólo recibieron la Dd y

Figura N° 19: Hipersensibilidad mediada por Ac en ratas Wistar adultas.



—●— Ratas sensibilizadas con 500 μ grs de ASB en ACF (Ds) por vía intraplantar.*

—○— Ratas sensibilizadas con 5.000 μ grs de ASB en ACF (Ds) por vía intraplantar.*

---●--- Ratas que solo recibieron la Dd.

* La reacción fue medida a los 26 días post Ds con 50 μ grs de ASB por vía intradérmica en el pabellón de la oreja.

que se utilizaron como control, presentaron un porcentaje de hinchazón promedio de $18,45 \pm 3,8$ para las 4 hs, $11,98 \pm 3,77$ para las 24 hs y $15,33 \pm 4,14$ para las 48 hs.

El análisis estadístico de los resultados aplicando el Test de Student indicaron que los valores obtenidos en ambos grupos experimentales fueron estadísticamente significativos ($p < 0,001$) con respecto al grupo control en todos los tiempos estudiados.

Como se describe en Materiales y Métodos, un lote constituido por 4 animales, de cada uno de los grupos experimentales, recibió la misma Dd por vía id en el flanco previamente depilado. La máxima reacción se observó a las 4 hs en los animales inoculados con 500 μ grs de ASB como Ds presentando en todos los casos edema y eritema. La magnitud de la reacción disminuyó a las 24 y 48 hs. El 100% de los animales que habían sido inoculados con 5000 μ grs de ASB como Ds mostraron el mismo cuadro que el grupo anterior a las 4 hs; pero en este caso en el 50% se observó a las 24 hs, en la zona de inoculación de la Dd, lesiones necróticas de piel. La Tabla IX resume los resultados, del diámetro del eritema, obtenidos. Cada valor representa el promedio de los 4 datos individuales para cada grupo.

Tabla IX: Hipersensibilidad mediada por anticuerpos en ratas adultas inmunizadas con 500 ó 5000 μ grs de ASB en ACF y desencadenadas a los 26 días pi con 50 μ grs de ASB en el flanco derecho.

Grupo	Ds	Dd	Diámetro del eritema a las		
			4hs	24hs	48hs
Experimental	500 μ grs	50 μ grs	15 \pm 1,22	12,25 \pm 1,03	6,75 \pm 1,35
Control	-	50 μ grs	-	-	-
Experimental	5000 μ grs	50 μ grs	13 \pm 1,22	12,5 \pm 2,50*	9 \pm 1,00
Control	-	50 μ grs	-	-	-

* Promedio de 2 valores individuales . La intensidad de las lesiones de piel impidió la medición correcta del diámetro del eritema.

Los estudios histológicos, realizados en las muestras provenientes del flanco como de la oreja muestran a las 4 hs post Dd marcado edema en la dermis reticular con depósitos de fibrina y extravasación difusa de eritrocitos lo que parece indicar hemorragia de poca magnitud. Los capilares de la dermis reticular y de la capa muscular se presentaron congestivos, con pavimentación de leucocitos polimorfonucleares; las células de las paredes capilares se observaron tumefactas con focos de necrosis. En el tejido intersticial pericapilar se visualizaron leucocitos polimorfonucleares formando manguitos. El infiltrado inflamatorio se extiende difusamente a toda la dermis. La lesión se presenta como una vasculitis leucocitoclástica intensa y reciente, correspondiendo al cuadro histológico de un fenómeno de Arthus (Fotos N°12 y 13).

A las 24 hs los fenómenos vasculíticos persisten con un intenso infiltrado de polimorfonucleares coexistiendo con linfocitos y monocitos (Foto N°14). Estas células predominan en los cortes obtenidos a las 48hs lo que sería compatible con la aparición de una reacción de HR. A las 72 hs el cuadro ha disminuido y solo se presentan secuelas de las lesiones.

En los cortes provenientes de los animales del grupo control que sólo recibieron la Dd, no se observaron lesiones.

En base a los resultados descriptos se decidió utilizar la dosis de 500 μ grs para ser empleada en las experiencias posteriores.

Foto N° 12: Corte de la oreja de una rata de 3 meses de vida sensibilizada con 500 μ grs de ASB en ACF por vía sc y desencadenada con 50 μ grs del Ag por vía id en el pabellón de la oreja. 4 hs pi. Se observa en la dermis reticular y en la hipodermis, manguitos perivasculars bien definidos constituidos por leucocitos polimorfonucleares. El infiltrado se extiende también entre las fibras musculares estriadas y el pericondrio del cartílago auricular. (120x).



Foto N° 13: Corte de la oreja de una rata de 3 meses de vida sensibilizada con 500 μ grs de ASB en ACF por vía sc y desencadenada con 50 μ grs del Ag por vía id en el pabellón de la oreja. 4 hs pi. Detalle de los manguitos perivasculares en la dermis. Obsérvense los leucocitos, la trombosis y necrosis de las paredes vasculares con migración de polimorfonucleares a través de las mismas. Coexiste extravasación eritrocitaria leve. (200x).

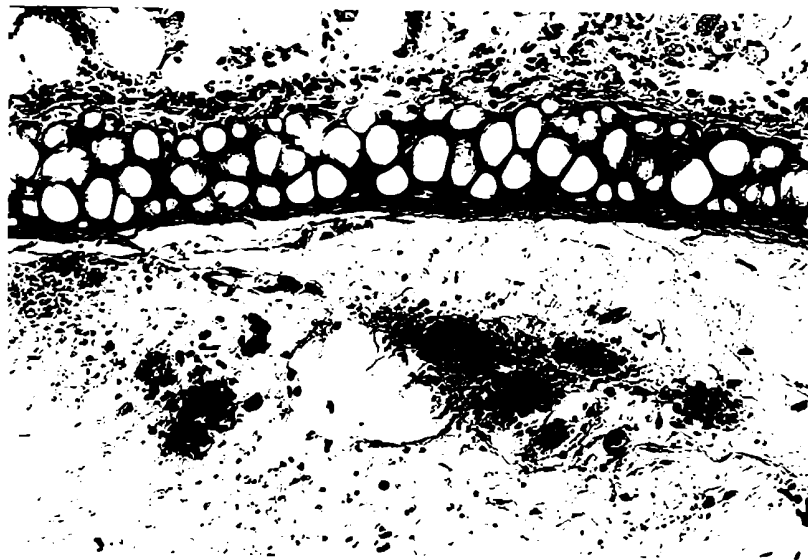
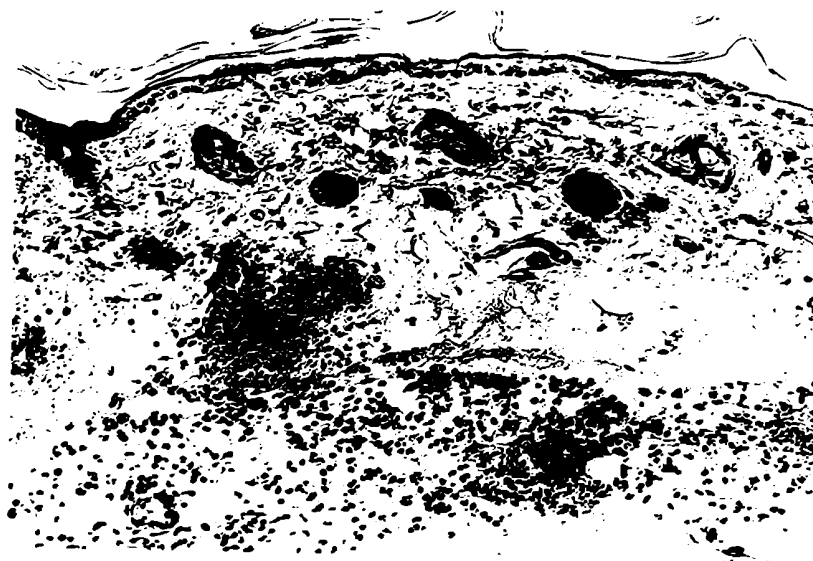


Foto N° 14: Corte de la piel de una rata de 3 meses de vida sensibilizada con 500 μ grs de ASB en ACF por vía sc y desencadenada con 50 μ grs del Ag por vía id en el flanco derecho. 24 hs pi. Se observa infiltrado inflamatorio de leucocitos polimorfonucleares que compromete difusamente la dermis, sobre todo alrededor de los vasos sanguíneos. En un sector se evidencian depósitos de fibrina. (160x).



res ya que resultó la menor cantidad de Ag con la que pudo ser lograda una buena respuesta inmune .

Por lo tanto siguiendo la misma metodología descripta se inocularon ratas Wistar de 2,3,4,5,6,8 y 11 días de vida con 500 μ grs de ASB en ACF por vía ipl como Ds.

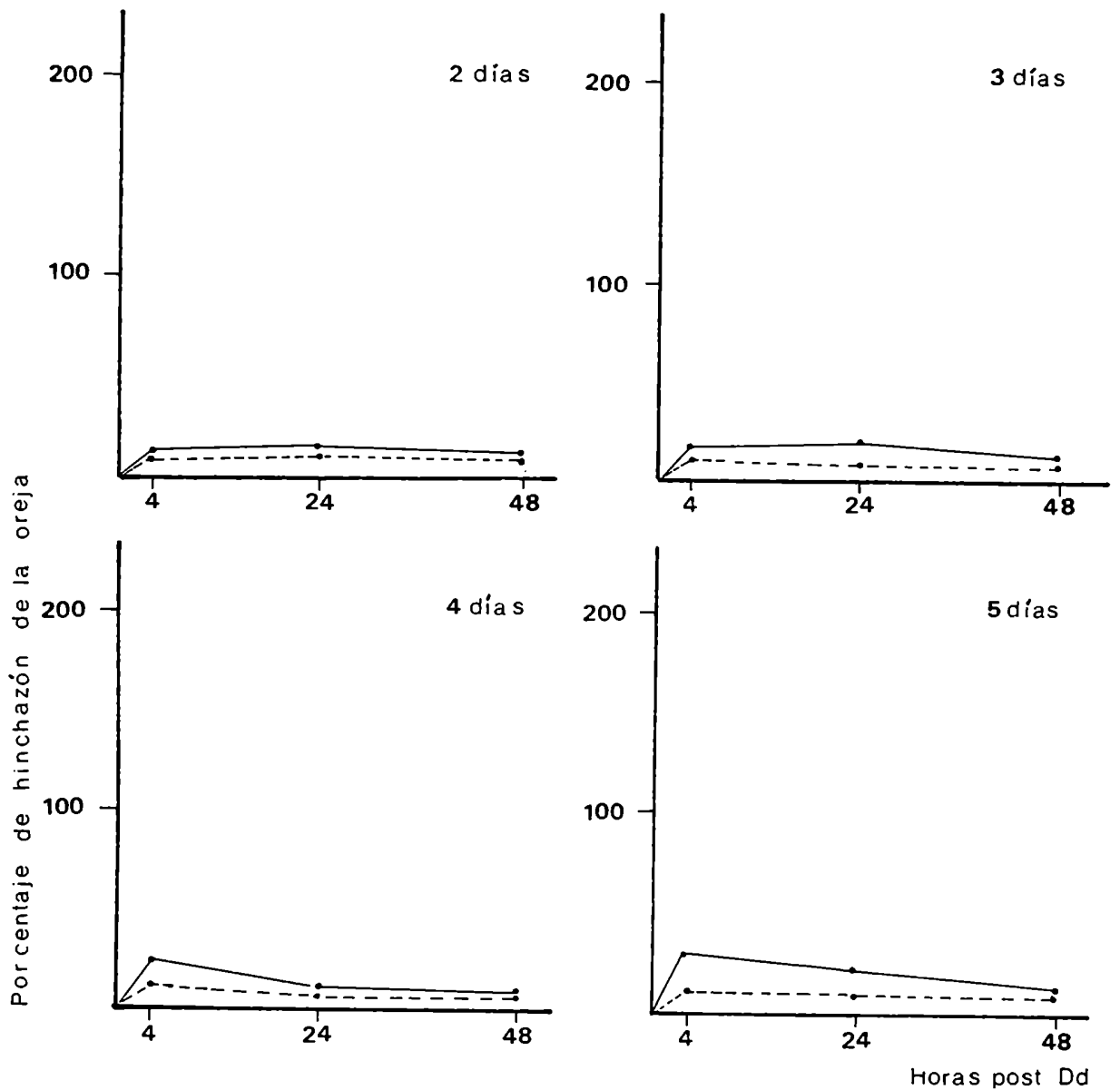
La Figura N°20 muestra los resultados obtenidos en los porcentajes de hinchazón de las orejas a las 4 , 24 y 48hs después de la Dd. Cada punto representa el promedio entre 6 a 8 valores individuales. Como puede observarse, se obtuvo reacción de hipersensibilidad de magnitud similar a la del animal adulto en ratas que recibieron la Ds a partir de los 6 días de vida.

En todos los casos se utilizó un grupo control de 4 animales que recibieron solamente la Dd.

El análisis estadístico del porcentaje de aumento obtenido en los animales de los grupos experimentales con respecto al grupo control, para cada edad, fueron estadísticamente significativos en las ratas inoculadas a partir de los 6 días de vida ($p < 0.001$).

En ninguna de las edades ensayadas se obtuvo respuesta positiva cuando los animales recibieron la Dd por vía id en el flanco previamente depilado. Por esa razón se sensibilizaron ratas de 18, 30, 45 y 60 días de vida. A los 26 días de la Ds estos animales recibieron la descarga conjuntamente con otro grupo de 4 animales para cada edad, no inmunizado previamente, que sirvieron de control.

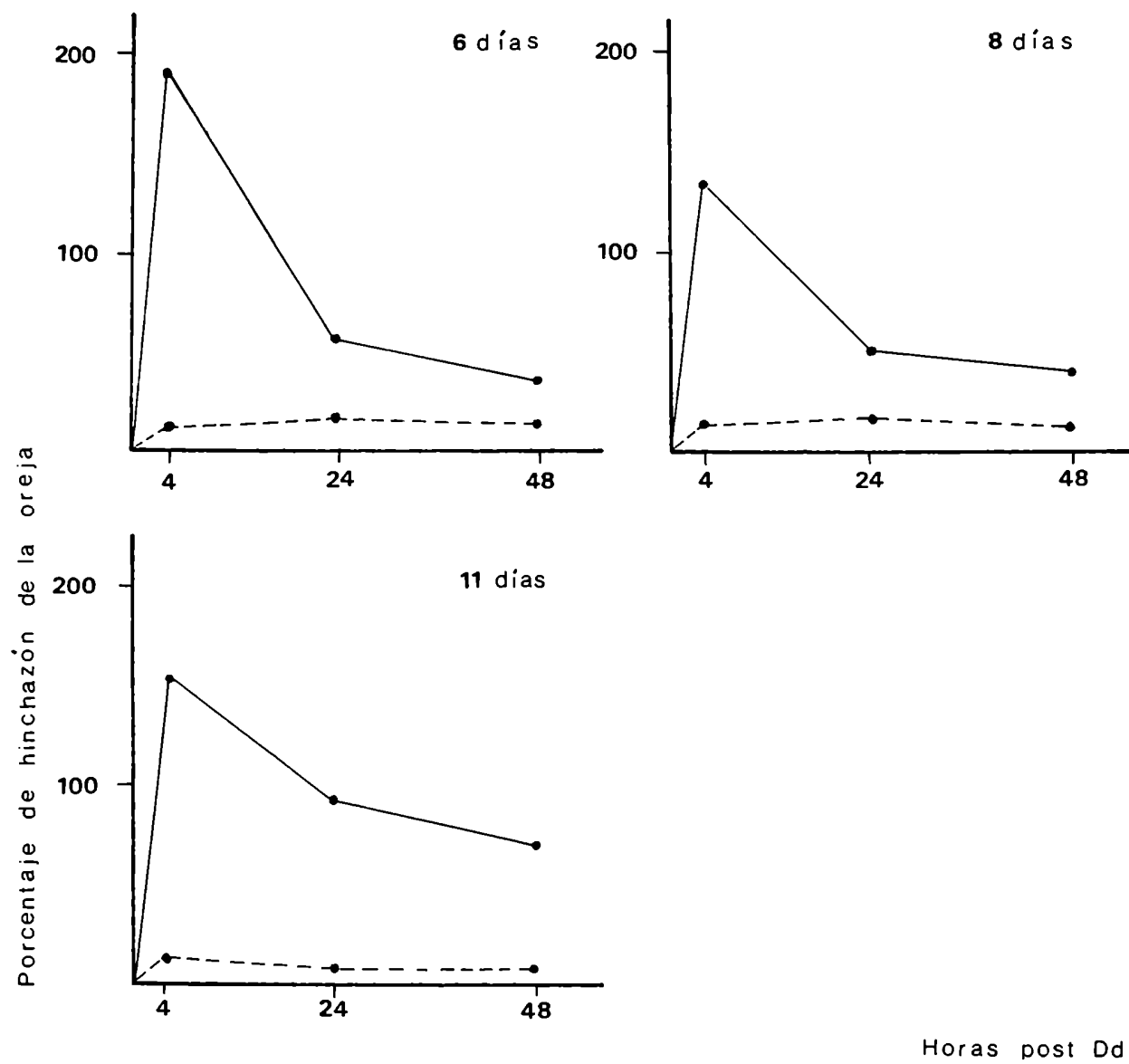
Figura N° 20: Hipersensibilidad mediada por Ac en ratas Wistar de distintas edades.



—•—•— Ratas que recibieron una Ds de 500 μ grs de ASB en ACF por vía intraplantar y una Dd de 50 μ grs de ASB por vía id en la oreja el día 26 pi.

- - -•- - - Ratas controles que solo recibieron la Dd.

Figura N° 20: Continuación



La Tabla X resume los resultados obtenidos.

Tabla X: Hipersensibilidad mediada por anticuerpos en ratas de distintas edades inmunizadas con 500 μ grs de ASB en ACF y desencadenadas a los 26 días pi con 50 μ grs de ASB en el flanco derecho.

Edad	Tratamiento	Nºde positivos / Total de animales	Diámetro del eritema (mm) \pm ES		
			Horas post Dd		
			4hs	24hs	48 hs
18 días	Ds + Dd	(1/10)	2	7	5
	Control Dd	(0/4)	-	-	-
30 días	Ds + Dd	(1/10)	10	4	0
	Control Dd	(0/4)	-	-	-
45 días	Ds + Dd	(4/8)	11,25 \pm 1,25	6,75 \pm 0,75	3,25 \pm 0,63
	Control Dd	(0/4)	-	-	-
60 días	Ds + Dd	(7/10)	12,28 \pm 0,78	7,14 \pm 1,01	4,43 \pm 0,53
	Control Dd	(0/4)	-	-	-

Los animales de 18, 30 y 45 días de vida en las cuales se consideró la reacción positiva presentaban edema pero eritema leve comparado con el de gran intensidad que se encontró en el animal adulto. Cuando se inocularon a los 60 días de vida, el eritema fue más intenso que en las edades anteriormente mencionadas pero de todas maneras no se observó la reacción tan evidente como la que se obtuvo en el animal de 3 meses de vida.

4.5. TRANSFERENCIA MATERNO FETAL DE Ac:

Los primeros ensayos estuvieron destinados a determinar el Ag a utilizar y el momento óptimo de la preñez para la inmunización de las hembras con el objeto de estudiar la transferencia de Ac a través de tejidos fetales y/o leche. Se determinó en hembras adultas la cinética de formación de Ac hacia GRC y hacia ASB tanto en la respuesta primaria como en la secundaria. Los detalles de la inmunización de las ratas fue descripta en Materiales y Métodos en los esquemas experimentales XII a XV. En la Figura N°21 se observan los resultados obtenidos. Cada punto representa el promedio de 3 valores individuales. El nivel de Ac séricos anti-GRC resultó demasiado bajo tanto en la respuesta primaria como en la secundaria (Figura N°21 a) como para poder ser empleado en los ensayos de transferencia pasiva natural. En cambio los valores de Ac alcanzados en ambas respuestas cuando los animales se inmunizaron con ASB (1,706 el día 53 pi para la respuesta primaria y 17.066 el día 10 después de la segunda inoculación para la respuesta secundaria) los hicieron aptos para los estudios propuestos (Figura N°21 b). Si bien el nivel de Ac obtenido en la respuesta secundaria fue mayor, se consideró el de la respuesta primaria suficientemente alto para poder realizar las experiencias.

A los 16 días de la inoculación del Ag se comenzó el apareamiento. Considerando que el período de gestación de la rata es de

Figura N° 21 a: Respuesta primaria y secundaria anti-GRC en ratas adultas. Los animales fueron inculados con una o dos dosis (separadas por 60 días) de 10^5 GRC por vía sc.

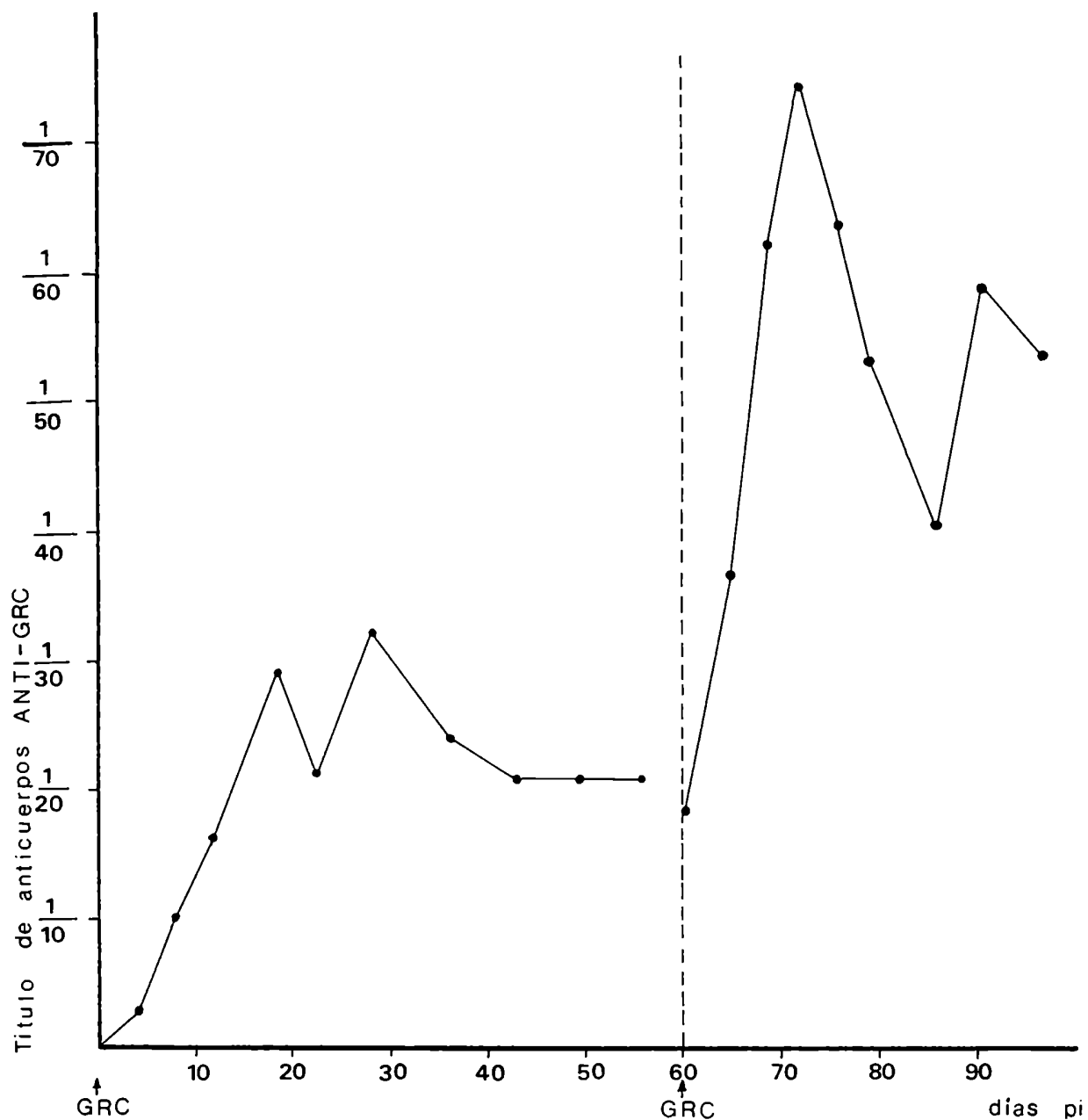
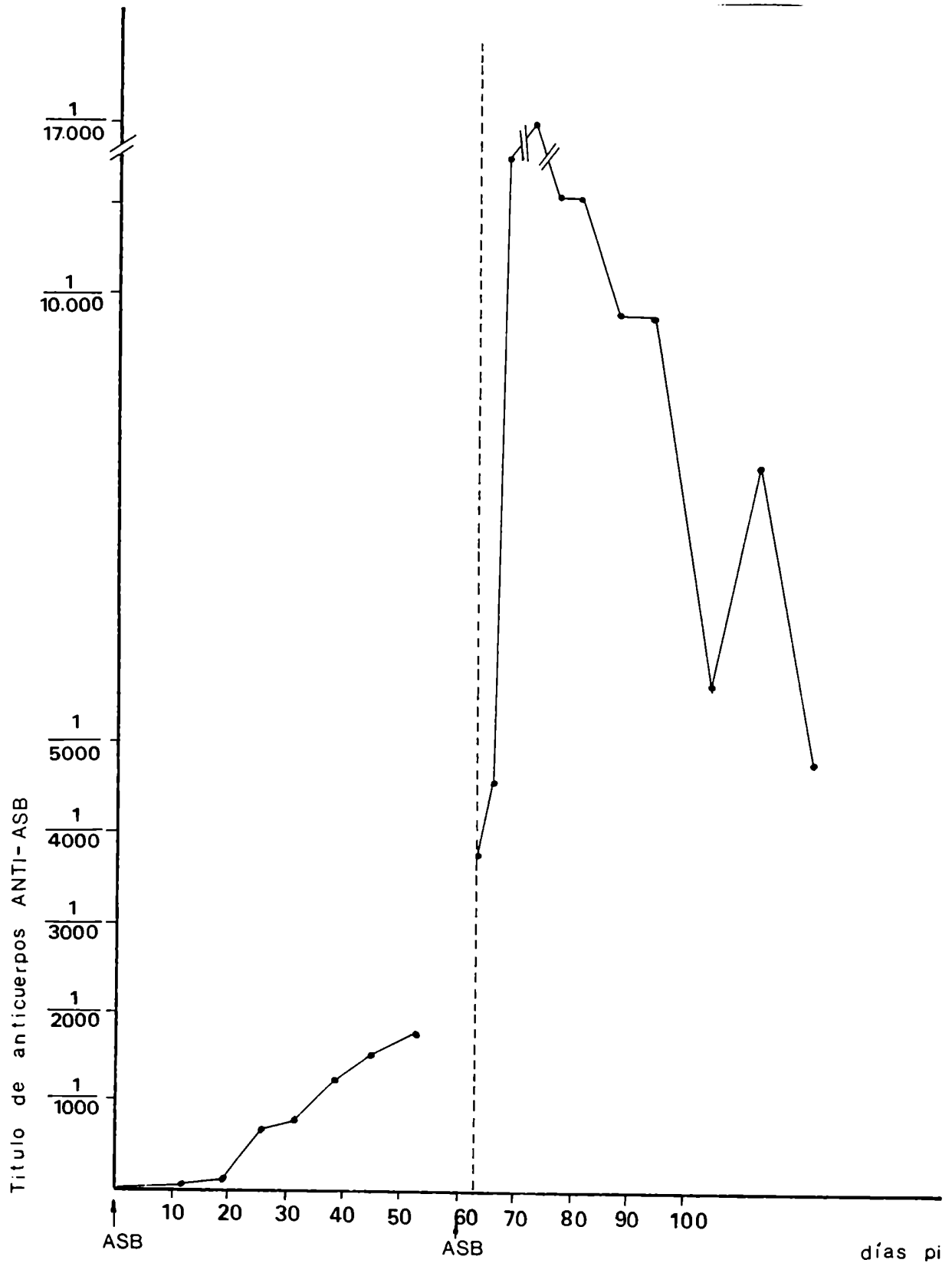


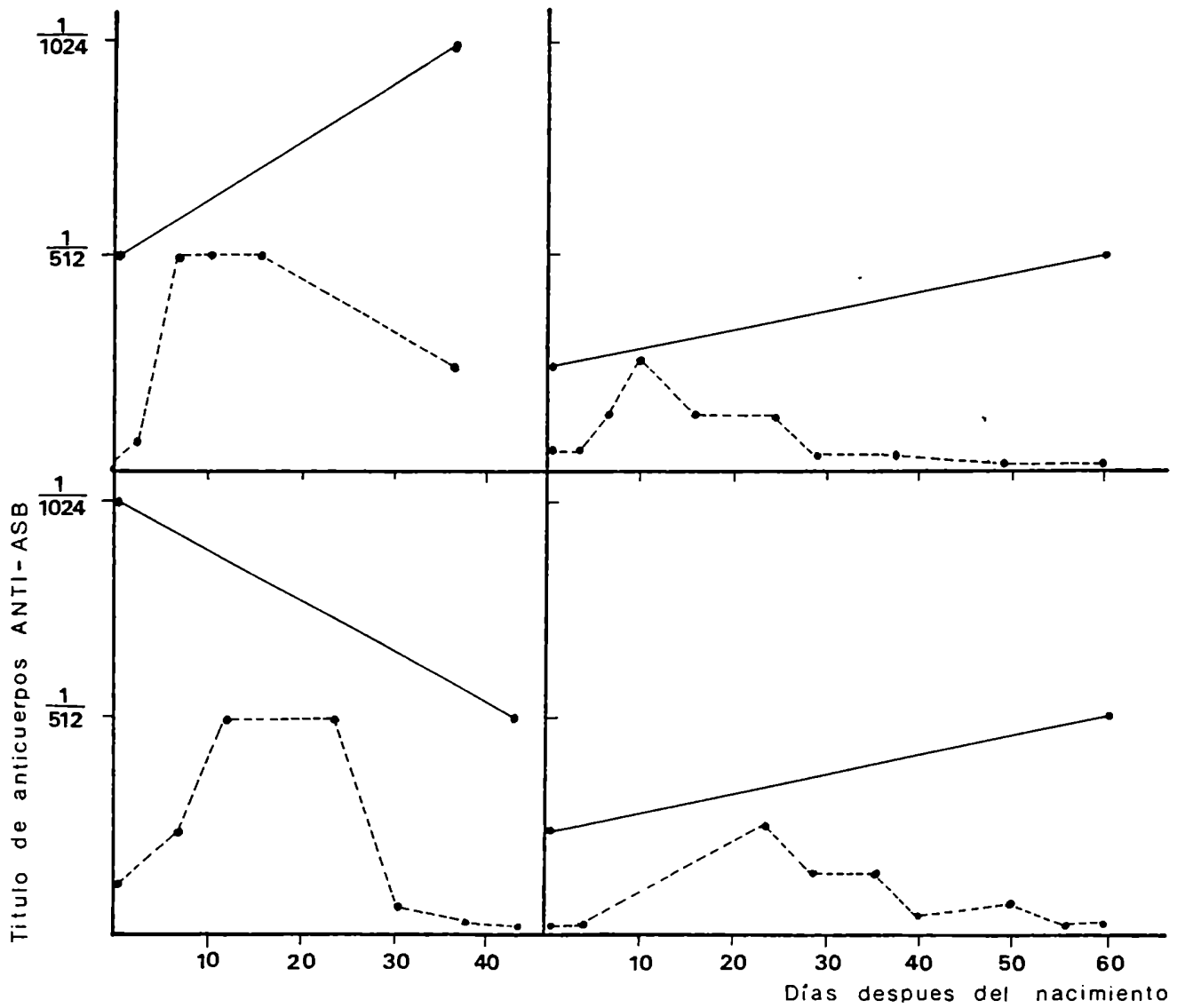
Figura N° 21 b: Respuesta primaria y secundaria anti-ASB en ratas adultas. Los animales fueron inoculados con una o dos dosis (separadas por 63 días) de 500 μ grs de ASB en ACF por vía ipl.



21 a 23 días, se lograba, de esta manera, un buen nivel de AC séricos hasta alrededor de 20 días después de la parición. En la Figura N°22 se observan los resultados obtenidos en 4 madres inmunizadas. Se determinó el título de Ac maternos en el momento del nacimiento de las crías y al final de la experiencia, es decir, alrededor de 60 días después de la parición. También se observa en la Figura N°22 los valores séricos obtenidos en las crías; estos Ac representarían los transferidos por tejidos fetales (valor al nacimiento) junto con aquellos transferidos por leche. A pesar que los animales permanecieron con sus madres hasta los 60 días de vida, en la mayoría de los casos los Ac disminuyen a partir del día 25, momento que resulta coincidente con la finalización de la lactancia. En todos los casos, el nivel de Ac sérico de las crías en el momento del nacimiento fue menor al de los Ac séricos maternos.

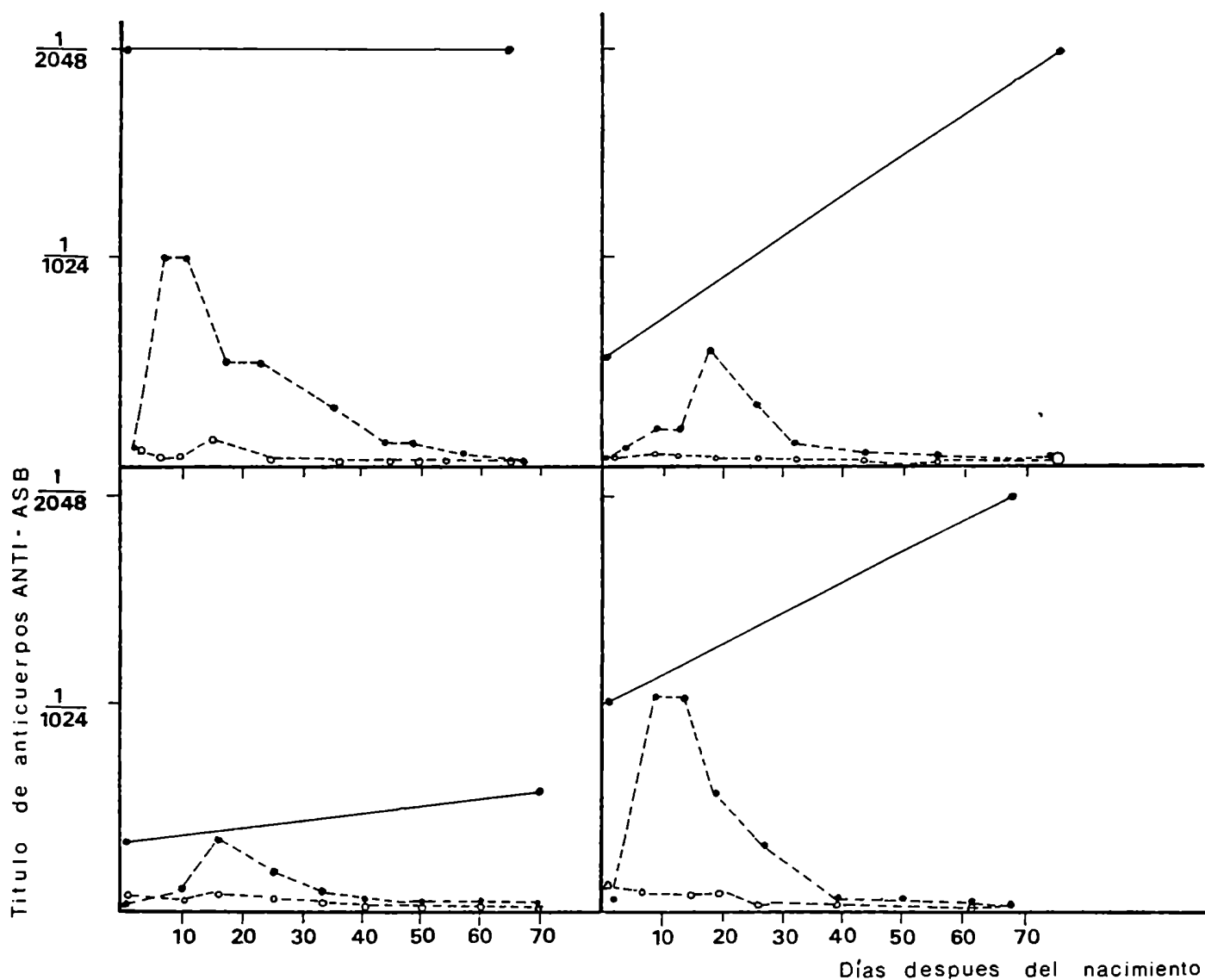
La Figura N°23 muestra los resultados obtenidos en experiencias de cruzamiento de crías entre madres inmunes y no inmunes realizados con el objeto de deslindar la participación, en la transferencia, de Ac a través de tejidos fetales o de la leche. Las crías provenientes de 4 madres inmunizadas (a las cuales también se les determinó el título de Ac en el momento de la parición y al final de la experiencia), se intercambiaron con las otras madres no inmunizadas cuyos alumbramientos se registraron simultáneamente. Puede apreciarse el bajo nivel de Ac transferidos

Figura N° 22: Transferencia materno-fetal de Ac anti-ASB.



- Nivel de Ac maternos. Las madres fueron inmunizadas con 500 μ grs de ASB por vía intraplantar 40 días antes del alumbramiento.
- - - • - - - Nivel de Ac en las crías: Ac transferidos a través de tejidos fetales y leche.

Figura N° 23: Transferencia materno-fetal de Ac anti-ASB. Intercambio de crías con madres no inmunizadas.



- Nivel de Ac maternos. Las madres fueron inmunizadas con 500 μ grs de ASB en ACF por vía intraplantar 40 días antes del alumbramiento.
- Nivel de Ac en las crías de las madres inmunizadas amamantadas por madres sin inmunizar.
- Nivel de Ac en las crías de madres no inmunizadas amamantadas por por madres inmunizadas.

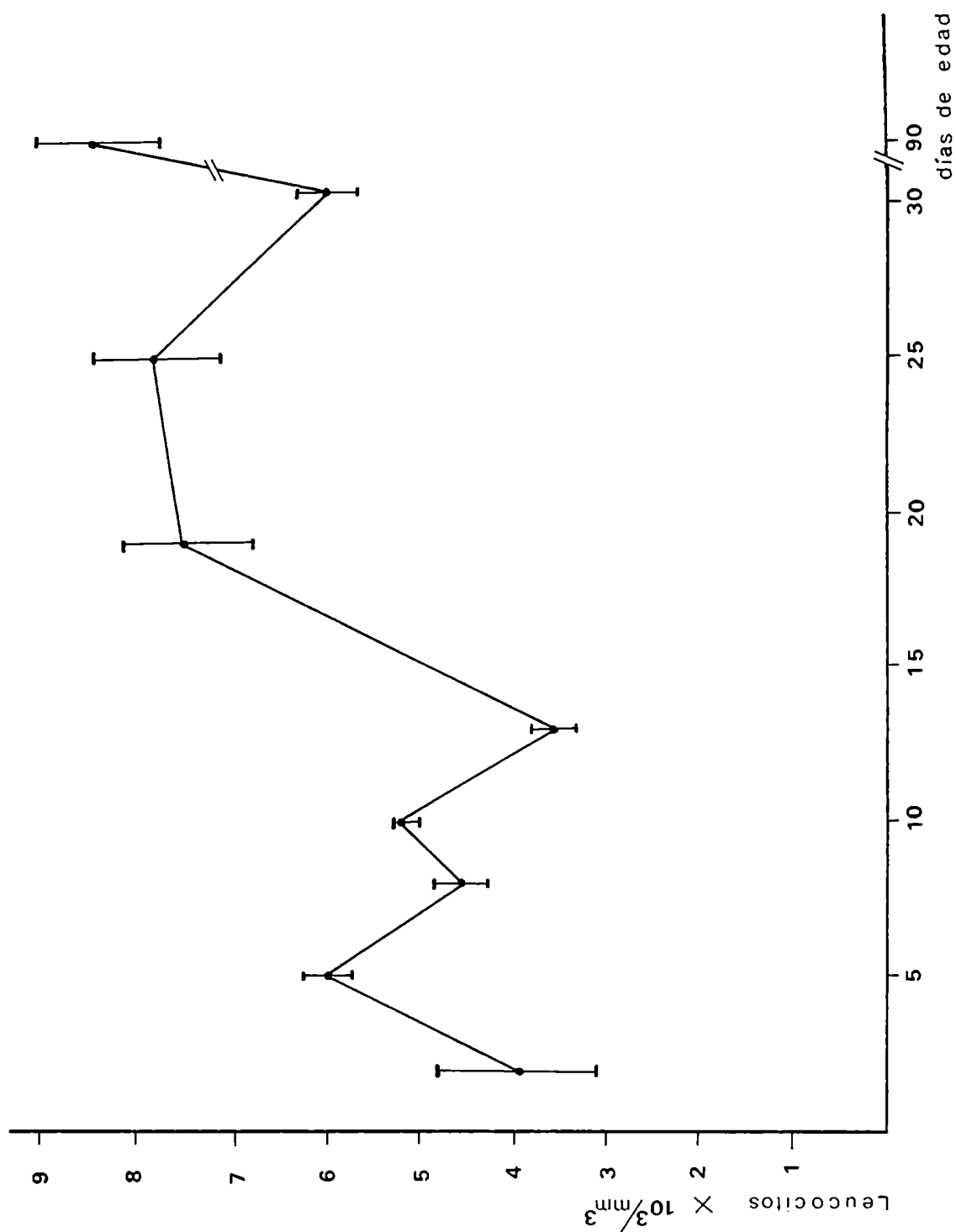
a través de los tejidos fetales en los sueros provenientes de las crías nacidas de madres inmunizadas amamantadas por las hembras sin inmunizar; los títulos van disminuyendo hasta hacerse indetectables aproximadamente a los 20 días post-nacimiento. Es evidente que la transferencia pasiva natural de Ac más importante se realiza a través de la leche como surge de los títulos de Ac registrados en las ratas nacidas de madres no inmunizadas pero amamantadas por hembras inmunes.

4.6. ESTUDIO DE LAS CELULAS COMPROMETIDAS EN LA RESPUESTA INMUNE

4.6.1. Recuento y Fórmula leucocitarios

Los valores de leucocitos totales en sangre periférica de ratas Wistar de distintas edades está graficado en la Figura N°24. Cada punto representa el promedio de por lo menos 5 animales de cada grupo etario. Aunque se encontraron marcadas variaciones individuales probablemente debidas a que la cepa Wistar es de exocría, el número total de leucocitos sanguíneos tiende a aumentar con la edad de los animales (3.920 ± 594 en ratas de 2 días y 8.537 ± 705 en adultas de 3 meses de vida). Se observó una disminución importante en los animales de 13 días de vida (3.600 ± 228) con respecto a ratas de menor edad ($5.200 \pm 83,5$ a los 10 días) o más adultas ($7.628,34 \pm 849,3$ a los 19 días de vida). Los animales

Figura N° 24: Valores absolutos de leucocitos sanguíneos en ratas Wistar de diferentes edades.
($\bar{x} \pm ES$)



de 32 días de vida también presentaron una disminución en el recuento de leucocitos sanguíneos (6.007 ± 490) con respecto a los de 25 días (7.940 ± 860) y a los animales adultos (8.537 ± 705).

La Tabla XI muestra el porcentaje de cada uno de los tipos celulares sanguíneos observado en ratas Wistar de distintas edades estudiados en frotis coloreados con May Grunwald-Giemsa.

Tabla XI: Fórmula sanguínea (%) en ratas Wistar de distintas edades.

Edad(días)	Linfocitos	Neutrófilos	Basófilos	Eosinófilos	Monocitos
2	70 - 85	15 - 25	0 - 1	0	0 - 4
5	79 - 95	5 - 17	0	0 - 1	0 - 4
8	79 - 97	2 - 18	0	0	0 - 3
10	79 - 86	13 - 21	0	0	0 - 1
13	90 - 98	2 - 10	0	0	0
19	70 - 85	15 - 30	0 - 1	0	0 - 3
25	76 - 94	6 - 23	0	0	0 - 1
32	50 - 80	20 - 40	0	0 - 3	0 - 1
90	75 - 85	14 - 25	0	0	0 - 3

Como puede observarse existe un amplio rango en los porcentajes de los distintos tipos celulares dentro de cada grupo etario oscilando entre los mismos valores en la mayoría de los casos. Hace excepción a esto el porcentaje de linfocitos y neutrófilos poli

Figura N° 25: Valores absolutos de linfocitos sanguíneos en ratas Wistar de diferentes edades.
($\bar{x} \pm ES$).

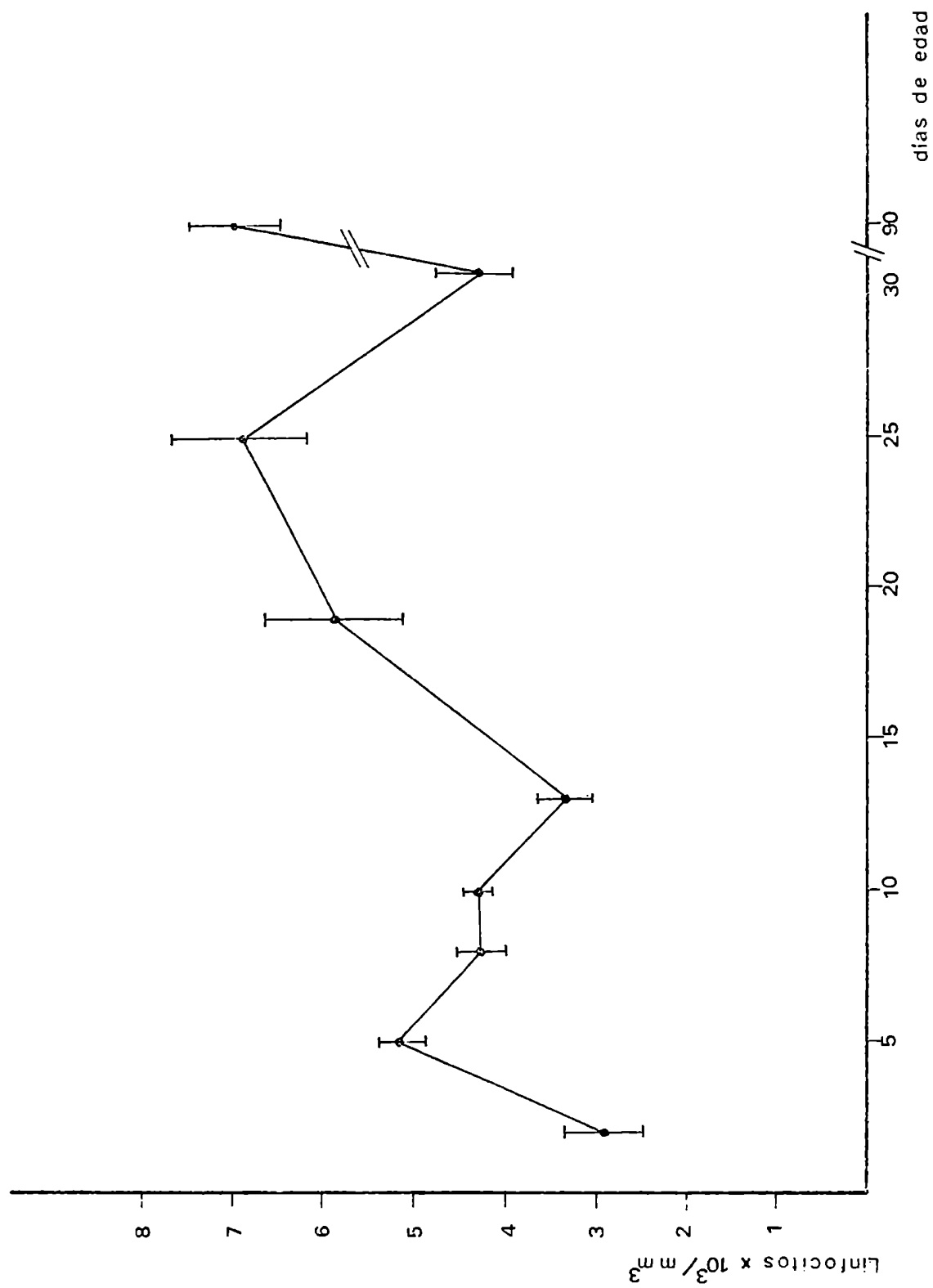
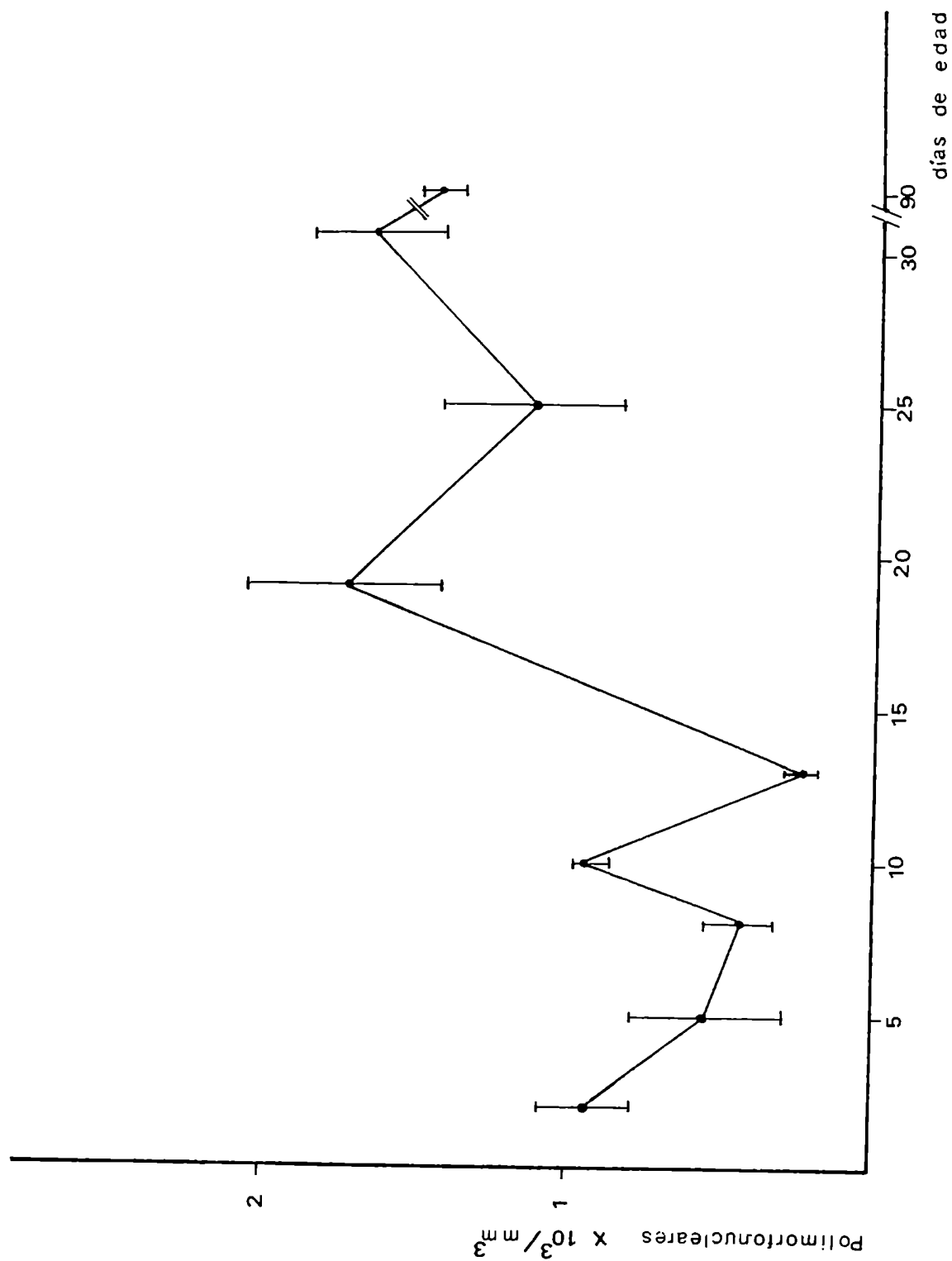


Figura N° 26: Valores absolutos de leucocitos polimorfonucleares sanguíneos en ratas Wistar de diferentes edades. ($\bar{x} \pm ES$).



morfonucleares detectados en las ratas de 13 y 32 días.

La Figura N°25 muestra el número absoluto de linfocitos sanguíneos en ratas de distintas edades. Cada cifra representa el promedio de por lo menos 5 valores individuales. También en este caso se observa el aumento, con la edad de los animales, en el número de linfocitos (2.995 ± 404 en ratas de 2 días y 6.977 ± 664 en adultos de 3 meses); también se comprueba una disminución de esos tipos celulares a los 13 y 32 días de vida.

En lo que respecta al valor absoluto de neutrófilos polimorfonucleares, puede apreciarse en la Figura N°26, que también varía con la edad de los animales, desde $932,4 \pm 197$ en ratas de 2 días de vida, hasta la cifra promedio de 1468 ± 83 a los 3 meses. Es llamativo el descenso que se observa a los 13 días de vida (212 ± 47) que se incrementa bruscamente a los 19 días ($1784,4 \pm 348$).

4.6.2. Análisis del exudado peritoneal

Las células del exudado peritoneal fueron extríadas y analizadas como se describe en el punto 3.5.2. de Materiales y Métodos. La coloración con Naranja de Acridina permite la diferenciación de cada uno de los tipos celulares existentes en la cavidad peritoneal de acuerdo a su imagen microscópica:

Linfocitos: células de tamaño mediano, con núcleo verde y citoplas

ma ausente o presente en un polo o como en un anillo alrededor del núcleo, en este caso de color rojizo (Foto N°15 a).

Macrófagos: células de mayor tamaño con núcleo grande y verde. Gran citoplasma verde claro con numerosas granulaciones de color rojo brillante (lisosomas) (Foto N°15 b).

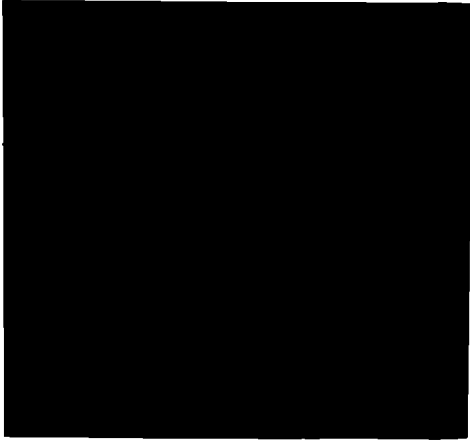
Mastocitos: células también grandes que se encuentran ocasionalmente y cuando aparece presenta núcleo amarillento con gran número de granulaciones citoplasmáticas de color rojo (Foto N°15 c).

Polimorfonucleares: células medianas con núcleo de forma característica verde-amarillo. Citoplasma verdoso con granulaciones rojizas escasas (Foto N°15 d).

La Figura N°27 muestra los porcentajes de cada uno de los tipos celulares descriptos residentes en la cavidad peritoneal de ratas Buffalo/Sim de distintas edades. Los macrófagos representaron el 70-80% del total de células desde el nacimiento hasta los 12 días de vida, valor que desciende al 43% en los animales de 20 días.

A la inversa, los linfocitos representan el 15-25% desde el nacimiento hasta los 12 días de vida y luego aumentan relativamente hasta alcanzar, a los 23 días de vida el porcentaje del animal adulto (50%). Menos frecuente es la presencia de polimorfonucleares cuyo valor promedio no superó el 6% en todas las edades estudiadas excepto un leve incremento entre los 18 y 20 días (9 y 13%).

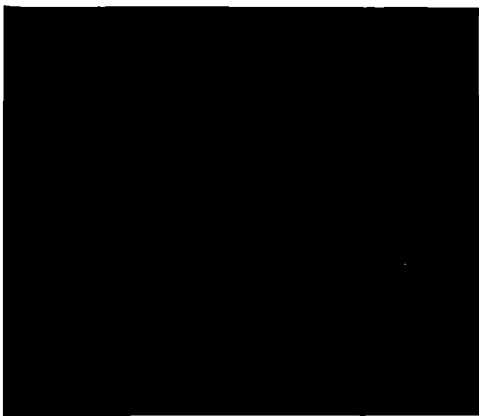
Foto N° 15: Coloración con Naranja de Acridina de células del exudado peritoneal de ratas Buffalo/Sim. (300x)



a: Linfocito



b: Macrófago

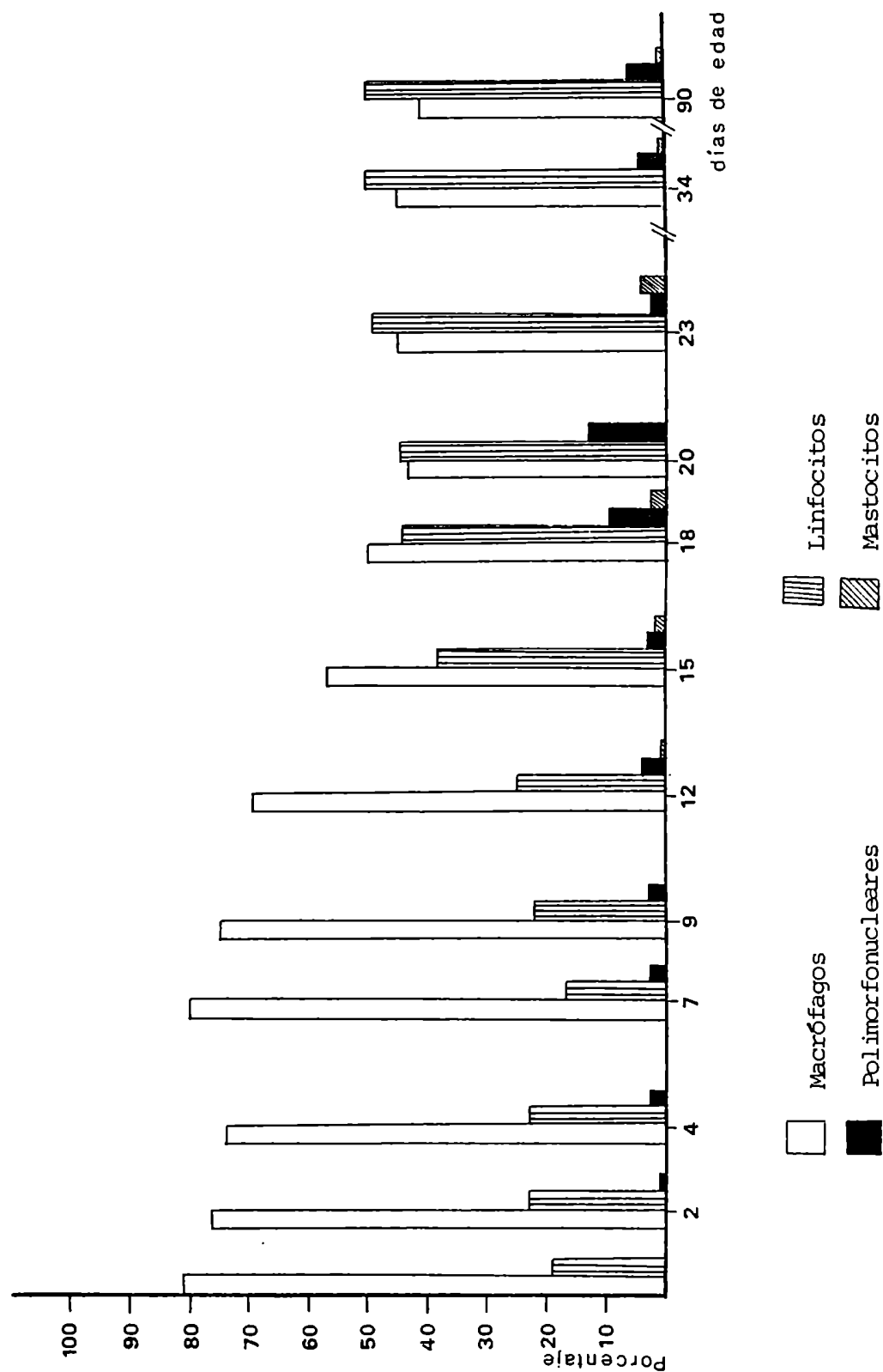


c: Mastocito



d: Polimorfonuclear

Figura N° 27: Composición porcentual del exudado peritoneal de ratas Buffalo/Sim de distintas edades.



Sólo ocasionalmente se registraron mastocitos que oscilaron entre 1 y el 4%.

4.6.3. Distribución de las poblaciones linfocitarias

Se determinó el porcentaje de las poblaciones de linfocitos T y B en bazo y timo de ratas Buffalo/Sim de distintas edades. La técnica empleada fue la inmunofluorescencia indirecta descrita en Materiales y Métodos. En esa sección también se detallaron las técnicas aplicadas en la valoración de los antisueros que se utilizaron para la marcación de los linfocitos T y B cuyos resultados son los siguientes:

- La concentración de la γ -globulina de rata valorada por el método de Lowry fue de 16 mgr/ml de proteína. La corrida inmunoelectroforética contra suero de conejo anti-suero total de rata sólo presentó bandas de precipitación en la zona correspondiente a las γ -globulinas séricas. Con el suero de conejo anti- γ -globulina de rata se obtuvo máxima precipitación con 200 y 250 μ grs de antígeno. La corrida inmunoelectroforética también presentó bandas únicamente en la zona correspondiente a las γ -globulinas séricas cuando fue enfrentado con suero total de rata. Una dilución 1/10 resultó óptima para marcar linfocitos B por inmunofluorescencia indirecta.

- El SAT se valoró por cuatro procedimientos:

- 1) Recuento leucocitario: la Tabla XII expresa el número de leucocitos sanguíneos por mm^3 obtenido en diferentes tiempos post-inoculación de ratas adultas.

Tabla XII: Acción del SAT sobre los linfocitos sanguíneos de ratas adultas en distintos tiempos pi.

Conejo N°	Ratas N°	0 hs	4 hs	24 hs	48 hs
1	1	20.200	7.300	3.000	3.800
	2	15.900	10.700	7.200	7.000
2	1	13.100	2.100	3.300	4.000
	2	20.800	900	3.200	5.800
3	1	10.400	11.300	5.900	4.200
	2	10.400	11.700	3.900	3.800
Normal (sin inocular)	1	9.700	9.800	12.000	10.100
	2	18.800	16.400	12.400	15.500

Los sueros provenientes de los tres conejos resultaron activos, es decir que produjeron un descenso de más del 50% en el recuento leucocitario. De todas maneras se utilizó un pool de los sueros provenientes de los conejos N°1 y 2 en estas experiencias.

- 2) Una dilución del suero de 1/120 fue capaz de lisar el 50% de células tíficas y 1/40 el 95% en los ensayos de citotoxicidad

mediada por complemento.

- 3) Sobre cortes de bazo y nódulo linfático de ratas adultas se obtuvo marcación positiva, utilizando la técnica de PAP, en el área paracortical (zona T) siendo negativa en los centros germinativos (zona B).
- 4) Por inmunofluorescencia indirecta se determinó que una dilución de 1/10 resultaba óptima para marcar linfocitos T de suspensiones celulares tímicas.

En todos los casos, sólo se consideraron positivas las células que presentaban marcación fluorescente neta en su superficie (Foto N°16).

Previo a su procesamiento los órganos fueron pesados y los resultados figuran en la Tabla XIII. Cada cifra representa el promedio de por lo menos 4 valores individuales. Se observa un incremento en el peso del bazo hasta los 90 días de vida a diferencia del timo cuyo peso aumenta hasta alcanzar el máximo a los 60 días de vida y luego se mantiene constante.

En la Figura N°28 se muestran los porcentajes de linfocitos T y B en bazo y timo de ratas Buffalo/Sim de distintas edades. Cada valor representa el promedio de por lo menos 4 animales. En timo se observó, en todas las edades estudiadas, marcación positiva (80-90%) para linfocitos T.

En pocos casos no incluidos en la Figura se obtuvo marca-

ción de linfocitos B que representaron el 1-3% de las células.

Tabla XIII: Peso (en grs) de bazo y timo de ratas Buffalo/Sim de distintas edades.

Edad (días)	Timo	Bazo
2	0,014	0,024
7	0,045	0,044
10	0,040	0,045
13	0,043	0,047
15	0,058	0,055
18	0,110	0,104
30	0,171	0,124
60	0,339	0,3574
90	0,3250	0,5501

Los valores en bazo variaron con la edad de los animales. A los 2 días de vida el 33% de las células presentaron tinción positiva para linfocitos T que varía considerablemente del porcentaje obtenido en el animal adulto (51%). Este porcentaje se alcanza ya en las ratas de 10 días de vida.

Cuando se utilizó anti- γ -globulina de rata para marcar las inmunoglobulinas que caracterizan a los linfocitos B, los valores observados en las ratas de 2 días de vida también fueron menores si se los compara con los de los animales de 90 días (18%

Foto N° 16: Inmunofluorescencia indirecta de células provenientes del timo de ratas Buffalo/Sim de 3 meses de vida. Se observa marcación neta en la superficie. (120x).

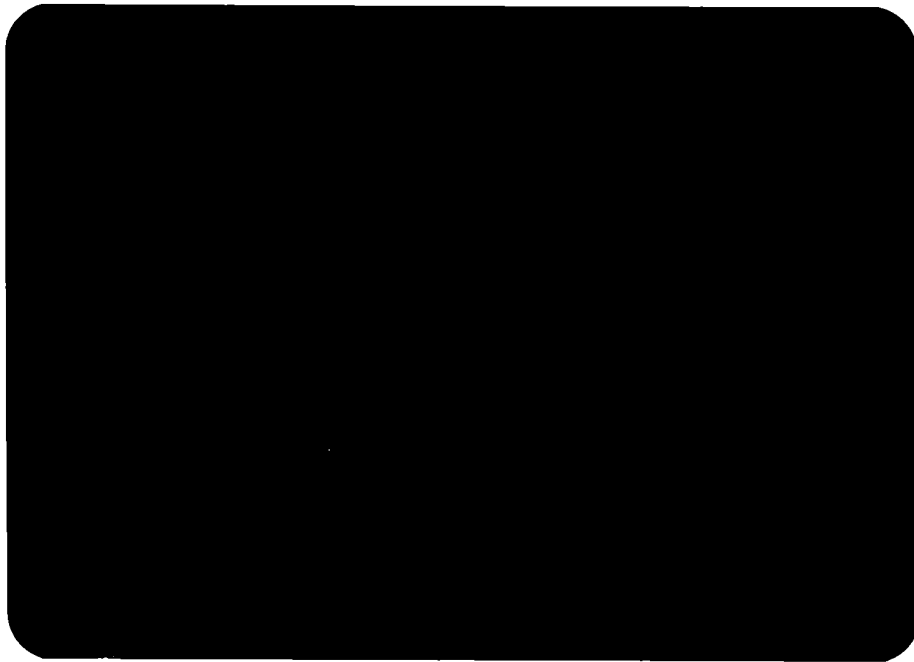
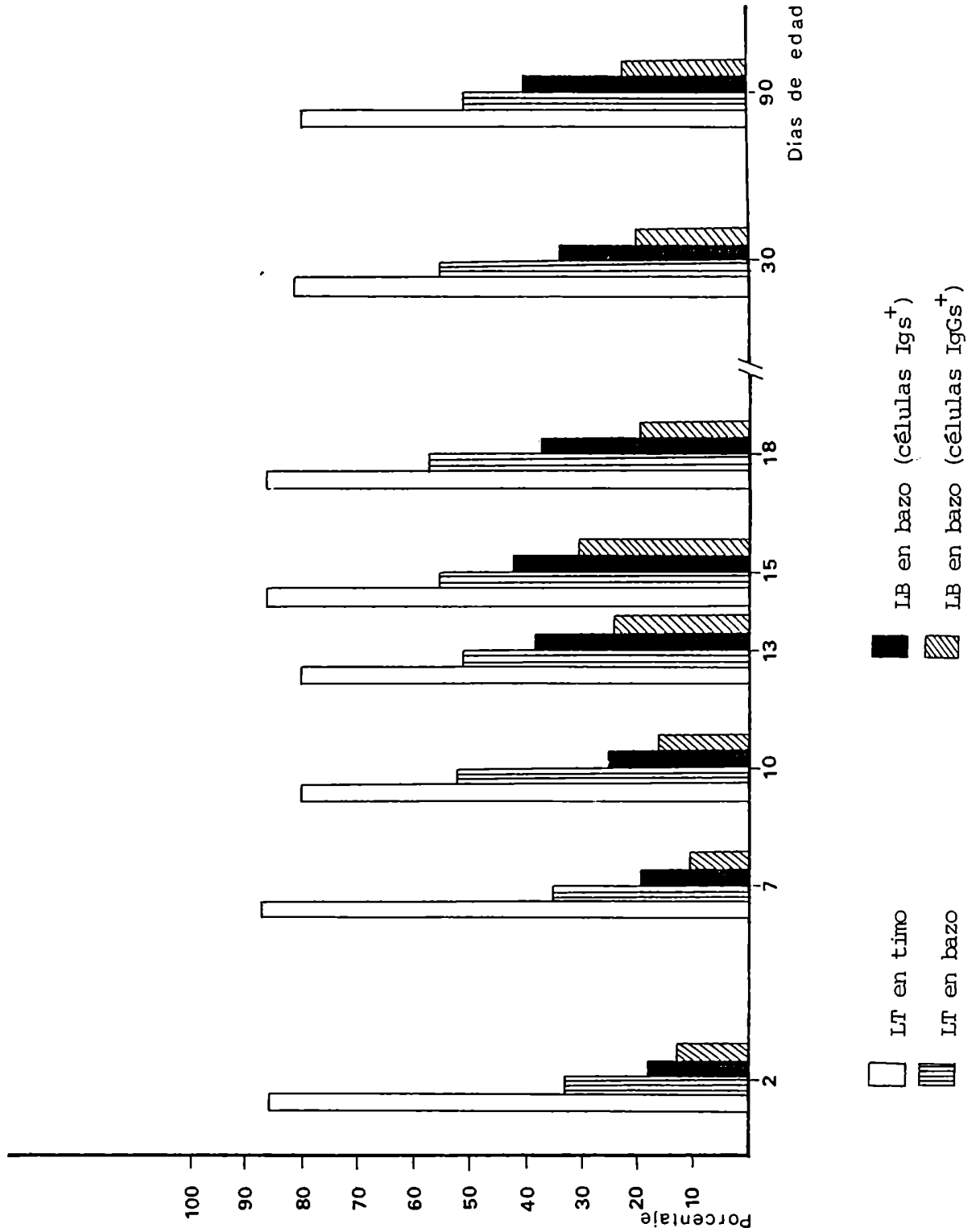


Figura N° 28: Composición porcentual de linfocitos T y B en timo y bazo de ratas Buffalo/Sim de distintas edades.



y 40% respectivamente). Como se observa en la Figura, estos valores se alcanzan a los 13 días de edad es decir, más tardíamente que aquellos mencionados para linfocitos T esplénicos. Los porcentajes de linfocitos B portadores de IgG en su superficie también son bajos (13%) en las ratas de 2 días de vida, aumentan paulatinamente con la edad (30% a los 15 días) y descienden levemente (23%) en el animal adulto.

5. DISCUSION

La maduración de la competencia inmunológica que da como resultado un individuo inmunocompetente implica una serie de mecanismos de diferenciación más que la acumulación de mutaciones genéticas. Si esto es correcto, la población celular competente presente en el período perinatal posee toda la información genética requerida para, por ejemplo, sintetizar la gran diversidad de especificidades que pueden expresarse en las moléculas de anticuerpos. En su sentido más estricto el término diferenciación se refiere a los acontecimientos que ocurren dentro del núcleo de una célula que conducen a la elección de determinadas propiedades que transmiten a las generaciones celulares siguientes. Se ha propuesto que el reordenamiento de la estructura cromosómica que da lugar a la aparición de un programa genético nuevo en las células hijas ocurre solamente durante determinados ciclos celulares.

Por ejemplo dichos pasos de diferenciación tienen lugar en el linaje B durante la selección de los genes de la región variable de los anticuerpos y cuando se produce el cambio ("Switch") de isotipo de las inmunoglobulinas. Sin embargo para la mayoría de los críticos cambios que se producen durante el desarrollo y funcionamiento del sistema inmune no ha podido

ser demostrado si se trata de verdaderos pasos de diferenciación o de la expresión de un programa genético pre-existente como respuesta a estímulos apropiados. Habitualmente se denomina a estos cambios como "maduración".

El estudio de la expresión en el tiempo de esta maduración del sistema inmune ha aportado en las últimas décadas, conocimientos fundamentales para la comprensión del funcionamiento integral del sistema inmune en diferentes especies animales.

El sistema inmune de los mamíferos no es totalmente funcional durante la vida fetal ni al nacimiento. A partir de este momento sobreviene una gradual maduración, la cual se completa después de un período post-natal cuya duración depende de la especie y está determinado genéticamente.

El desarrollo de la competencia inmunológica en la rata ha sido poco estudiado, y por lo tanto algunos de los aspectos más salientes del tema se desarrollan en esta Tesis.

Las cepas, utilizadas en los laboratorios, de Rattus norvegicus descienden de animales salvajes de origen asiático, que invadieron Europa Occidental a principios del siglo XVIII. A principios del 1900 las raras variantes albinas de origen europeo usadas en su momento como curiosidad constituyeron los primeros núcleos de crianza en el Instituto Wistar de Filadelfia. De ellos se derivaron más de cien líneas endocriadas, entre ellas

las empleadas en este trabajo (144) (145).

Se comenzó el análisis ontogénico estudiando las proteínas séricas normales para conocer las eventuales modificaciones relacionadas con la edad y aquellas que pudieran surgir después de una estimulación antigénica.

Al respecto, trabajos de otros autores empleando diversas técnicas electroforéticas con distintos soportes, como papel de filtro (146), bloque de almidón (147), gel de almidón (148) para caracterizar los componentes proteicos del suero de ratas, mostraron divergencias en los resultados obtenidos con respecto al grado de resolución y número de componentes del suero, quizás debido a las distintas técnicas empleadas y a las diferencias en las cepas, edad y sexo de los animales.

El examen de las fracciones proteicas del suero de la rata adulta descrito en esta Tesis, estudiadas por electroforesis en acetato de celulosa a pH 8,6, ha demostrado la existencia de cinco fracciones: albúmina, α_1 , α_2 , β y γ -globulinas. Similares resultados fueron obtenidos por Benjamín y Weimer (146), trabajando sobre papel de filtro al mismo pH. Los porcentajes relativos de cada una de las fracciones del suero del animal adulto determinados por elución de cada banda, fueron semejantes a los obtenidos por Jankovic y col. (149). Estos autores no resol-

vieron en α_1 y α_2 , considerando ambas bandas como una sola, cuyo porcentaje relativo fue del 26.8%.

Si se comparan estos resultados con los obtenidos con suero de ratas de distintas edades, se detectan algunas diferencias . Estas residen en los porcentajes relativos de la albúmina y de la α_2 -globulina. La albúmina se encuentra disminuída en ratas recién nacidas, aumentando a los 2 días después del nacimiento. En contraste, el porcentaje de la α_2 -globulina es mayor en la rata de 6 horas de vida y va disminuyendo con la edad. Si se compara los valores absolutos, de las fracciones proteicas estudiadas, sólo la α_2 -globulina está aumentada en el momento del nacimiento con respecto a los valores hallados en el animal adulto. Es improbable que el incremento de la α_2 -glo**bulina** esté relacionada a la disminución de la albúmina ya que el porcentaje de las otras fracciones permanece relativamente constante en todas las edades.

Beaton y col (150), analizando el suero por elctroforesis en gel de almidón, encontraron una proteína que corría en la zona de las α_2 -globulinas lentas en sueros provenientes de ratas preñadas y ratas jóvenes, desde el nacimiento hasta los 35 días de edad, no detectándose en edades posteriores. El gel de almidón es de mayor resolución que el acetato de celulosa y es probable que esta α_2 -globulina, en las condiciones de nuestro tra

bajo quede enmascarada en toda la banda correspondiente a las α_2 . El mayor contenido de α_2 -globulina en suero de animales de seis horas de vida podría ser explicada recordando que también se encuentra aumentada en el suero de ratas portadoras de tumores (150). Hubbard (151) formuló una hipótesis, en la cual propone varios mecanismos que explicarían el papel supresor sobre la respuesta inmune de la α_2 -macroglobulina. El hecho de que esta proteína esté presente en alta concentración tanto en recién nacidos como en hembras preñadas sugeriría su participación en la prevención del rechazo inmune del feto por la madre.

En lo que se refiere a las γ -globulinas séricas se detecta un aumento, ligado a la edad, de los valores absolutos aunque los porcentajes relativos se mantienen constantes. Lo mismo se observó para las α_1 y β -globulinas.

Es probable que esto refleje la adquisición de la capacidad de formar anticuerpos ante un estímulo antigénico dado.

Quizás la documentación más completa acerca de las clases de inmunoglobulinas presentes en el suero de la rata proviene de los trabajos de Bazin y col. (152). Ellos encontraron además de IgM, IgA e IgE, cuatro subclases de IgG (IgG_1 , IgG_{2a} , IgG_{2b} e IgG_{2c}) de las cuales la IgG_{2a} es la que se encuentra en mayor concentración en suero (153). Uno de los objetivos de este trabajo fue conocer la variación de las proteínas que pueden

participar en una respuesta inmune en ratas de distintas edades. Para ello, fue purificada la IgG del suero sin intentar determinar por el momento las subclases involucradas; se preparó suero de conejo anti-IgG de rata y se determinó la concentración de IgG en animales de distintas edades. El aumento de IgG sérica observado durante los primeros días después del nacimiento representaría la transferencia de esta inmunoglobulina de la madre a las crías a través de la leche, ya que se demostró (153) que después de la IgA, la IgG es la inmunoglobulina que se encuentra en mayor concentración en la leche de rata. El período en el cual los animales adquieren la capacidad de alimentarse por sí mismos, entre los 20 y 25 días de vida, coincide con el comienzo de la disminución de la IgG sérica, la cual presenta un mínimo a los 30 días de edad aproximadamente. El incremento observado a partir de este momento representaría la IgG sintetizada activamente por los animales, en respuesta a la estimulación antigénica ambiental.

La respuesta inmunológica a GRC , un antígeno T-dependiente, es deficiente en la rata durante los primeros días después del nacimiento, como lo demuestra el bajo nivel de aglutininas séricas y de CFA. La vía ip resultó mejor inductora de la formación de anticuerpos que la vía sc ya que, en el primer caso, comienzan a detectarse aglutininas en algunas ratas en bajos tí-

tulos a partir del 6to a 7mo día y recién a partir del día 12 de vida para la vía sc. Estas aglutininas fueron valoradas a los 7 y 14 días después de la estimulación antigénica. Es de hacer notar que, en el animal adulto el nivel de anticuerpos alcanzado fue también mayor cuando el antígeno fue inoculado por vía ip que por vía sc; la respuesta máxima de Ac circulantes se observó a los 14 (para la vía ip) y a los 28 (para la vía sc) días pi. Esto podría deberse a los caminos diferentes, según la vía, que sigue el antígeno para llegar al sistema inmune y estimularlo, es decir, captación del antígeno por parte de las células accesorias, posibilidades de procesamiento antigénico, transporte por vía sanguínea, etc.

La carencia de respuesta hacia GRC en animales de menos de 6 días de edad puede deberse a una inmadurez en el aparato inmuno competente o a la creación de un estado de tolerancia. La rata constituye un modelo adecuado para dilucidar este punto debido a que no posee anticuerpos naturales hacia GRC y por ende, no pueden ser transferidos pasivamente por la madre a las crías a través de tejidos fetales y / o leche (154). La respuesta hacia GRC requiere la interacción de por lo menos 3 tipos de células (27): a) células B , derivadas de la médula ósea, b) células T, dependientes del timo, c) células accesorias presentadoras del antígeno . Chiscon y Golub (77) demostraron que la maduración

de la funcionalidad de las células T y B en lo que respecta a la respuesta a GRC en el ratón tiene lugar en momentos diferentes. La competencia de las células B en bazo fue detectada "in vitro" ya a las 24 hs. del nacimiento. Tres días más tarde se detectó la funcionalidad de la célula T. Sherwin y Rowlands(32) trabajando con ratones adultos irradiados y reconstituídos con células de hígado fetal o neonatal, demostraron que si bien existen en estos órganos células B capaces de responder inmunológicamente, deben transcurrir aproximadamente 10 días para que las células T migren hacia el timo del huésped, sean liberadas a circulación y puedan recién entonces ejercer su función como células ayudadoras. En el ratón , la respuesta primaria a GRC es deficiente durante los primeros 20 días de vida en comparación con el ratón de 8 a 12 semanas (155) y alcanza los valores del animal adulto. entre la 4ta y 8va semanas. Carter y Rector(27) estudiando la aparición de células formadoras de anticuerpos hacia GRC en ratones neonatos, encontraron dos períodos en los cuales se incrementa el número de dichas células; el primero a los 4 días de vida y el segundo, de mayor intensidad, a los 10 días de vida. Los autores atribuyeron dicho incremento a la maduración del sistema procesador del antígeno.

Los trabajos de Argyris(156) concluyen que la transferencia de macrófagos de animales adultos a ratones de 3-5 días de

vida inmunizados con 10^8 GRC, aumenta la síntesis de Ac en estos animales y que tiene que existir una relación óptima entre el número de macrófagos funcionales y el número de células inmunocompetentes para obtener respuesta. Por el contrario Rabinowitz (155), no pudo incrementar el número de células formadoras de anticuerpos adicionando células provenientes del exudado peritoneal de ratones adultos a cultivos de células de bazo de animales jóvenes inmunizados con 2×10^8 GRC.

En la rata, Murczynska y col (154) no detectaron hemolisis ni células formadoras de anticuerpos cuando inocularon GRC al 20% por vía ip en animales de 3 días de vida. Dicha respuesta fue detectada recién en ratas inoculadas a los 12 días de edad. Estos autores pudieron sin embargo inducir la producción de anticuerpos en ratas lactantes mediante la transferencia de 12 a 36×10^6 células peritoneales provenientes de animales adultos. Por lo tanto, la deficiente respuesta de anticuerpos a GRC en la rata se debería probablemente a una inadecuada funcionalidad del sistema macrofágico. Sin embargo, Weiss (157) encontró que los macrófagos presentes en las suspensiones de células esplénicas de rata inhiben el número de células formadoras de placas. Si bien en nuestro caso el porcentaje de macrófagos en las células del exudado peritoneal fue mayor en animales recién nacidos con respecto al adulto, naturalmente la cantidad abso-

luta resultó ser mucho más baja. Existe la posibilidad de que los macrófagos del lactante no hayan adquirido aún la capacidad de funcionar como células accesorias en una respuesta inmune, lo que involucra, la captación del antígeno, su procesamiento y la producción de señales inmunológicas a las poblaciones celulares reactivas. Trabajos anteriores han demostrado que los macrófagos de fetos y neonatos son inmaduros (156) (158), lo que explicaría también su facilidad para desarrollar un estado de tolerancia. Nadler y col (159) encontraron que, en ratones, la producción de anticuerpos está ligada a la capacidad de las células accesorias para expresar el antígeno Ia en su superficie lo cual ocurre entre las 2 y 3 semanas de vida. Se ha comprobado la existencia de un mecanismo autorregulador mediado por metabolitos del ácido araquidónico que suprime la expresión de este antígeno. Este mecanismo sería particularmente activo durante los estadios tempranos del desarrollo (160) y podría contribuir a la carencia de respuesta inmune durante el período perinatal. Recientemente, se ha demostrado que la α -fetoproteína secretada por un precursor de los macrófagos también inhibe la expresión del antígeno Ia (161). Argyris postuló que los macrófagos controlan parcialmente la aparición de células supresoras en ratones neonatos y que un incremento en el N° y/o actividad funcional de los macrófagos después del nacimiento disminuye el

Nº y/o funcionalidad de dichas células permitiendo así la adquisición de la capacidad inmunológica (162).

En el modelo utilizado en este trabajo es lícito pensar también que la deficiente respuesta de estos animales hacia GRC en los primeros días después del nacimiento se debe a la inmadurez del aparato inmunocompetente ya que no se obtiene respuesta con ninguna de las diferentes dosis y vía empleadas.

El estado de no respuesta descripto puede deberse, también como en el caso del ratón, a inmadurez de las células B derivadas de la médula ósea, a células T ayudadoras, o como se demostró para la rata, al sistema procesador del antígeno. Una posibilidad no explorada en este trabajo puede ser, como lo demuestran algunos autores, la existencia de gran número de células T supresoras en el bazo de animales jóvenes (88) (163) (164). Estas células actúan inhibiendo la respuesta de anticuerpos, afectando principalmente las células T que colaboran con las células B. No se puede descartar tampoco el posible papel supresor de factores séricos como la α -feto proteína que se encuentra normalmente en animales jóvenes (89) (165) aunque los trabajos realizados en rata no son concluyentes acerca de la inhibición por ésta de la respuesta "in vivo" de anticuerpos (166).

En lo que se refiere a nuestros estudios sobre la respuesta

secundaria a GRC, cuando las ratas de 2 días de vida fueron inoculadas con 10^9 GRC por vía ip, no solamente no hubo respuesta primaria sino que también fue inhibida la formación de anticuerpos séricos y el número de células formadoras de anticuerpos ante una segunda dosis similar dada a los 16 días de vida, momento en el cuál se detectó buena respuesta en los controles que no habían recibido la primera inoculación. Esta inhibición fue menos evidente cuando ambas dosis fueron disminuídas a 10^7 GRC o se cambió la vía de administración del antígeno por la ruta sc. Este estado de tolerancia parcial por alta dosis de antígeno persiste más allá de los 60 días de vida, ya que la respuesta humoral todavía se encuentra disminuída, aunque no tan marcadamente, si las ratas reciben la segunda inoculación de GRC en ese momento. Resulta dudoso atribuir el estado de tolerancia a la eliminación de clones específicos para el antígeno. Creemos que podría deberse a la persistencia del antígeno en los tejidos, ya que es un hecho conocido que la duración del estado de tolerancia depende de dicha persistencia. (167) (168). Ya ha sido mencionado que la tolerancia se induce con mayor facilidad en animales cuyo sistema inmunológico no ha alcanzado aún la madurez del adulto. Nossal (169) ha demostrado que puede inducirse tolerancia de varios meses de duración a antígenos celulares como los eritrocitos mediante la inoculación de grandes dosis de GRC a ratas de un día de

vida, continuando las inyecciones por varias semanas.

Cuando en lugar de GRC se utilizó otro antígeno timodependiente, la ASB, se observó también una deficiente respuesta primaria, en las ratas recién nacidas.

A diferencia de lo que ocurre con los GRC, la respuesta es muy lenta, ya que los niveles más altos de anticuerpos se obtienen en este caso recién a los 53 días luego de la administración del antígeno.

Dado que el Ag se administra con ACF, podría suponerse que persiste en los tejidos el tiempo necesario para permitir la maduración de los elementos que participan en la respuesta ya que se libera muy lentamente desde la zona de inoculación, de manera que está aún disponible cuando la rata adquiere su madurez inmunológica.

Cuando se utilizaron los GRC como antígeno, se observó que el período entre la edad en la cual comienza a detectarse respuesta (6 días) y la de la capacidad de responder como un animal adulto (16 días) era de 10 días aproximadamente.

En el caso de ASB , el comportamiento de la rata es diferente: la magnitud de la respuesta se va incrementando con la edad, pero sin embargo aún a los 60 días de vida no se obtiene un nivel de anticuerpos semejante al observado en el animal con-

siderado adulto (90 días). Si bien la capacidad de un organismo para responder a un estímulo antigénico estaría determinada genéticamente (33), dicha capacidad no puede ser expresada en su totalidad en los animales recién nacidos. El momento en el cual una especie dada es madura para responder inmunológicamente depende del tipo de antígeno involucrado (170) (171). Debido a ello era razonable esperar que la rata respondiese de diferente manera a GRC y a ASB, a pesar de ser ambos antígenos timo-dependientes.

Otros de los factores de los cuales dependerían las diferencias observadas son la forma de administración y liberación del antígeno, la maduración de los elementos que participan en la respuesta y la cantidad de células inmunológicamente competentes disponibles.

En lo que se refiere a la hipersensibilidad mediada por anticuerpos tipo III, los factores involucrados en la reacción son anticuerpos circulantes, polimorfonucleares y complemento.

En nuestros estudios hemos encontrado una relación muy evidente entre el nivel de anticuerpos séricos anti-ASB y la magnitud de la reacción de hipersensibilidad mediada por anticuerpos. Kostiala (128), trabajando con ratas adultas de la cepa Spreague-Dawley, inmunizadas con 500 μ gr de ASB en ACF y desen-

cadenadas el día 21 pi encontró que la reacción en la oreja es 100 veces más sensible que la clásica medición del diámetro de la reacción cutánea. Nosotros encontramos que la respuesta obtenida en animales de distintas edades fue del "todo o nada", ya que ratas inmunizadas a los 5 días de vida no respondieron cuando fueron desencadenadas en la oreja, mientras que los animales inmunizados a los 6 días mostraron una respuesta francamente positiva que se asemejó en magnitud a la obtenida en el adulto de 3 meses de vida.

Es interesante destacar que los títulos de anticuerpos séricos en el momento de desencadenar la reacción, aunque diferentes ($1/8$ en animales de 5 días y $1/40$ en los de 6 días de vida), no alcanzaban la magnitud de los de animales de 3 meses ($1/680$ el día 27 pi). A pesar de estas diferencias, la intensidad de la reacción medida en la oreja fue similar a la del animal de 6 días. Esto indicaría que los anticuerpos séricos deben alcanzar un umbral mínimo a partir del cual la reacción es positiva independientemente del título obtenido.

Tanto las características histológicas de la lesión como el tiempo necesario para la máxima expresión de la reacción, (4 hs) indican que se trata de un típico fenómeno de Arthus. Anatómopatológicamente se observó vasculitis leucocitoclástica con importante edema y afluencia de leucocitos polimorfonucleares.

La variación en el comportamiento entre los animales sensibilizados a los 5 o 6 días de vida no puede ser atribuido a una diferencia en el número de polimorfonucleares ya que en el momento de la Dd (26 días post Ds) todos presentan valores similares a los del animal adulto (Figura 26). Como fue mencionado el complemento es otro de los elementos que participan en la reacción de Arthus. Se han obtenido niveles semejantes de complemento séricos en ratas de 25 y 32 días, edades que incluyen animales que dan respuestas negativa y positiva respectivamente, por lo que no puede atribuirse la falta de respuesta de los animales inmunizados a los 5 días de vida a fallas en su síntesis.

Lo mencionado hasta aquí está referido al fenómeno de Arthus realizando la Dd en la oreja de los animales.

Un cuadro diferente se presentó cuando la reacción fue desencadenada en la piel. En los animales inmunizados antes de los 18 días de vida no se observó ninguno de los signos macroscópicos que la caracterizan, es decir edema y/o eritema. A partir de esa edad y hasta los 30 días, en el 10% de los animales aparece respuesta positiva y el porcentaje fue aumentando progresivamente con la edad. Así, en las ratas inmunizadas a los 45 y 60 días de vida, el 50% y el 70% de los animales respectivamente presentaron una reacción de diámetro superior a los 10mm. Sin embargo, es de hacer notar que en ninguno de los casos mencionados

el eritema fue tan intenso como el observado en el animal adulto . Puede apreciarse entonces que en el caso que la Dd se administró en piel, la reacción fue progresiva con la edad, a diferencia de lo descrito anteriormente donde como se dijo fue del "todo o nada".

Estudios previos (64) han demostrado la deficiencia del cobayo recién nacido para expresar una reacción cutánea del tipo retardado a pesar de haberse comprobado competencia inmunológica de los linfocitos y monocitos. Estos animales, sin embargo, son capaces de expresar una reacción basófila cutánea en la oreja, con niveles semejantes al del cobayo adulto, y también en piel aunque en este caso de menor magnitud (172). Histológicamente, los animales presentaron en el lugar de la lesión una menor concentración de células mononucleares y un eritema más leve con respecto al observado en el animal adulto.

En lo que se refiere al fenómeno de Arthus tampoco es posible ponerlo en evidencia en la piel de estos animales hasta los 20 días después de la sensibilización, cuando han sido estimulados antigénicamente con sustancias proteicas luego del nacimiento. La reacción fue negativa a pesar de que ya a los 10 días post-sensibilización pudieron detectarse anticuerpos circulantes (64). Los trabajos de Waksman y Matoltsy (173) sugieren que diferencias intrínsecas entre la piel del cobayo recién nacido y la del adulto

además de la menor cantidad de células mononucleares, podrían explicar estas diferencias , ya que en el recién nacido la respuesta es deficiente aún después de la administración en la piel del antígeno conjuntamente con células mononucleares provenientes de animales adultos inmunizados. Meng (174), estudiando la capacidad del conejo para expresar la reacción de anafilaxia cutánea pasiva (ACP) demostró que si bien los animales, inmunizados en el momento del nacimiento con ASB, son capaces de sintetizar Ac específicos de la clase IgE, no expresan la reacción de ACP hasta los 3 meses de vida.

Estos resultados indican que las pruebas cutáneas involucran mecanismos extremadamente complejos cuya ausencia podría ser la causa por la cual la rata neonatal no es capaz de expresar una reacción de Arthus desencadenada en la piel. Tal vez debería tenerse en cuenta también el delgado espesor de la piel que sería responsable de una menor retención de antígeno inyectado , como postularon Janicki y Aron (175). La posibilidad de que el nivel de anticuerpos tenga influencia en la expresión de la reacción de Arthus cuando esta es desencadenada en piel en lugar de la oreja es remota, ya que también fue negativa cuando ratas neonatales con alto nivel de anticuerpos séricos anti-ASB transmitidos por la madre recibieron una descarga en la piel.

La endotoxina bacteriana, LPS , es un antígeno timo independiente, inmunogénico en cantidades de microgramos, capaz de provocar una respuesta humoral mediada por anticuerpos de la clase IgM cuando es inoculado por vía ip (176) (177) (178). La res-
puesta de anticuerpos de la rata adulta inoculada con 10 μ grs de Ag se caracterizó por ser de baja magnitud, y de niveles oscilan-
tes obteniéndose tempranamente post inmunización el título máxi-
mo.

Estos resultados concuerdan con los publicados por Hiernaux y col (179) en ratones inoculados con 20 μ grs de LPS. Rabinowitz (155) determinando células formadoras de Ac, observó que estos a-
nimales ya responden en la primera semana de vida, aunque su res-
puesta fue del 75% del valor de la del animal de 8 semanas. Estos autores sugirieron que, en el ratón, la actividad inmunológica de las células B se desarrollaría más temprano en la ontogenia que la de las células T, ya que la respuesta a GRC, (antígeno T de-
pendiente) alcanza los niveles del adulto recién entre la 4ta y 6ta semana de vida. En la rata , en cambio, la respuesta al LPS es muy pobre en los animales de 7 días y se va incrementando con la edad hasta que se logra los niveles del adulto recién cuando son inmunizados a los 32 días de vida. Es difícil atribuir estos resultados a una inmadurez de las células B ya que en nuestras experiencias, las ratas de 12 días de edad fueron capaces de sin-

tetizar anticuerpos cuando se utilizaron GRC como antígeno. Es probable que la falta de respuesta hacia LPS pueda ser atribuida a la actividad reguladora de células T supresoras, las cuales se encuentran en número muy elevado en el bazo de animales jóvenes. Los estudios de Mosier y Johnson (180) han demostrado que si se adicionan células de bazo provenientes de animales jóvenes a un cultivo de células esplénicas singeneicas se produce inhibición de la respuesta a antígenos T - independientes.

El tratamiento de las células esplénicas con suero anti- θ más complemento antes de ser adicionadas al cultivo, suprimió este efecto.

Los estudios realizados en la última década han demostrado que la sensibilidad de contacto es un fenómeno complejo que necesita para su producción y expresión, de la interacción de varios factores: unión del antígeno Ag a los tejidos de la piel; reconocimiento del Ag por una subpoblación especializada de linfocitos T, distribución a través del sistema linfoide de las células T inmunes y capacidad citotóxica de los linfocitos T efectores de la reacción.

La maduración ontogénica de cada uno de estos elementos es variable según las especies. Salvin y col (64) sensibilizaron cobayos de un día de vida con DNFB en Adyuvante Incompleto de

Freund por vía id y encontraron que el 50% de los neonatos reaccionaban positivamente a la aplicación tópica del agente 5 a 20 días más tarde. Además Uhr (181) pudo demostrar que estos animales pueden ser sensibilizados " in utero" 7 - 14 días antes del nacimiento. Por otra parte, el ratón de 2 días de vida es capaz de desarrollar hipersensibilidad retardada hacia DNFB mostrando además cambios morfológicos (blastogénesis) en los ganglios linfáticos regionales (182). Los ratones sensibilizados en el momento del nacimiento o 24 hs después, no manifiestan ninguna de estas respuestas.

En este trabajo se demostró que si se administra a la rata una dosis sensibilizante de DNFB durante la primera semana de vida no se obtiene respuesta. Esto puede deberse a la deficiencia en estos animales de algunos de los factores mencionados anteriormente ya que en la rata adulta es posible obtener una respuesta positiva. Para poder determinar si la rata es incapaz de sensibilizarse antes de los 8 días de vida o si no puede expresar la reacción en el momento en que recibe la dosis desencadenante, (14 días después de la Ds) habría que modificar el esquema de aplicación del antígeno, variando el tiempo entre la Ds y la Dd y quizás la dosis antigénica, cosa que resultaría impracticable debido a los problemas ya mencionados en Resultados (Punto 4.3) . En los últimos años, ha cobrado importancia el papel de las células de Langerhans,

normalmente presentes en la piel, como células presentadoras de antígeno. En la actualidad se acepta que estas células representan una población especializada de macrófagos, que participan en la inducción de la respuesta inmune hacia antígenos introducidos a través de la piel. Estas células también poseen en su superficie antígeno Ia y receptores para el fragmento Fc de la IgG y para C₃ (183). Además en ratones normales se encuentran en mayor concentración en la oreja que en otros sectores de la piel (184). La presencia de las células de Langerhans maduras en la piel es un requisito fundamental para el apropiado reconocimiento del antígeno por parte del linfocito T. Huff y col. (185) encontraron en cultivos de piel de embriones murinos de 17 a 19 días, luego de 45 semanas "in vitro", células con las características de las de Langerhans.

A diferencia de estas últimas no poseían gránulos por lo cuál las llamaron células intermediarias.

Es conocido el papel fundamental de los distintos tipos celulares en los mecanismos inmunológicos ya sean linfocitos T, B ó células accesorias. Como paso previo al estudio de la adquisición de la capacidad funcional de cada una de estas células, fue objetivo de este trabajo conocer su distribución en órganos linfoides y las posibles variaciones cuantitativas ligadas a la e-

dad de los animales.

En esta Tesis, los estudios de adquisición de competencia inmunológica se realizan en el período post-natal. Es por eso que el estudio de las poblaciones celulares se comenzó a partir de ese momento. Al respecto, se han detectado varias diferencias entre los animales recién nacidos y las ratas adultas. En primer lugar, en el neonato hay un menor número de células leucocitarias totales circulantes, incluyendo tanto leucocitos polimorfonucleares como linfocitos. Todos ellos, luego de algunas oscilaciones alcanzan los valores del adulto a partir de los 19 días de vida.

A partir del día 12 también aumenta la celularidad del bazo. Además es inferior el peso de los órganos linfoides estudiados, timo y bazo en las ratas neonatales, con respecto al animal adulto.

Los porcentajes de linfocitos T y B en el bazo de ratas recién nacidas, cuando se analizaron por inmunofluorescencia indirecta, también fueron inferiores a los encontrados en el animal adulto. En el ratón, el número total de células esplénicas IgM+ y Thy 1.2 + es también significativamente menor en el momento del nacimiento (186). Utilizando también inmunofluorescencia, Spear y col (187) encontraron que, en el ratón recién nacido, las células Ig+ representaban un 20% de las células nucleadas esplé-

nicas, aumentando hasta un 53% en el ratón de 60 días.

Los linfocitos T, en cambio, aumentaban solo un 7% desde el momento del nacimiento (20%) hasta los 2 meses de vida (27%). En nuestros estudios en la rata, a diferencia de los resultados obtenidos en el ratón por Spear y col. se observaron porcentajes semejantes a los del animal adulto en estadios más tempranos del desarrollo: 10 días de edad para las células T y 13 días de vida para las células B.

Es importante destacar que en la rata, la capacidad de desarrollar una respuesta celular de la magnitud observada en el animal adulto se adquiere más precozmente que la respuesta humoral. Sin embargo, cuando se marcaron las células B con anti-IgG o anti-

Y - globulinas totales se observó en los lactantes, un mayor porcentaje de dichas células que alcanzó un nivel máximo a los 15 días de edad y luego declinó. Este incremento puede ser atribuido, como ha sido sugerido por Rosenberg y Parish (54), a los anticuerpos citofílicos de la clase IgG transferidos pasivamente por la madre a través de la leche y/o tejidos fetales los cuales se unirían a los receptores Fc de las células neonatales. Cuando finaliza el período de lactancia cesa la transferencia de inmunoglobulinas y por lo tanto el porcentaje de células portadoras de Ig de superficie disminuye. Estos porcentajes pueden incluir células no linfoideas que han unido a sus receptores Fc, las inmunoglobuli

nas, o células K cuya presencia puede ser protectora para el recién nacido cuando aún no es enteramente competente.

El porcentaje de células T en el timo se mantuvo constante en todas las edades estudiadas. El hecho de no observar 100% de fluorescencia, a pesar de que el SAT fue elaborado con células tímicas totales podría ser atribuido a la sensibilidad de la técnica. La falta de correlación entre el contenido de linfocitos T en timo, que es similar en todas las edades, con el aumento gradual de esas células observado en bazo, permanece aún sin explicación.

Si el desarrollo de la capacidad inmunológica de las células linfoides periféricas en la vida temprana de la rata es primariamente el resultado del incremento de las células en los tejidos linfoides periféricos, de la maduración de las células individuales o del desarrollo del medio ambiente neonatal es un punto que necesita ser estudiado con mayor intensidad. Para ello será de utilidad el empleo de una amplia gama de anticuerpos monoclonales dirigidos contra células precursoras de los linfocitos y de distintas subpoblaciones maduras con diferente funcionalidad.

Como ha sido mencionado, la capacidad del neonato para desarrollar una respuesta inmune activa es influenciada por la

transferencia pasiva natural de anticuerpos maternos. En la rata y en el ratón, la placentación es del tipo hemoendotelial (188) y se sabe que la transferencia de inmunoglobulinas a través del saco vitelino no es importante (111). Nuestros datos utilizando madres inmunizadas con ASB corroboraron estos resultados. El intercambio de crías provenientes de madres inmunes a madres no inmunes y viceversa permitió conocer la proporción de anticuerpos transferidos por tejidos fetales y leche y su persistencia en el suero de los animales lactantes. El nivel de anticuerpos transferidos por tejidos fetales fue muy bajo en relación con aquellos transferidos a través de la leche y muy inferiores también con respecto al título presente en el suero de las madres inmunizadas. En cambio, cuando se estudió la transferencia exclusivamente a través de la leche, se observó que el título de anticuerpos, en la mayoría de los casos, lograba un máximo entre los 10 y 15 días de vida en niveles levemente inferiores a los maternos. A partir de ese momento, comenzaron a declinar, ya sea porque después de los 20 días las ratas son capaces de alimentarse por sí solas o bien porque la pared intestinal pierde la capacidad de absorber los anticuerpos maternos. Cómo influye la presencia de estos anticuerpos en la elaboración activa de una respuesta ante un estímulo antigénico en el neonato es un tema controvertido. Algunos autores han postulado la inhibición de la respuesta activa a través

de un mecanismo "feedback" (189) (190), otros en cambio, han sugerido la necesidad de la presencia de anticuerpos preexistentes como condición necesaria para la formación activa del animal recién nacido (3).

6. CONCLUSIONES

En este trabajo se realizaron ensayos experimentales tratando, a través de ellos de abarcar una amplia gama de estudios inmunológicos que pudieran aportar conocimientos sobre la maduración de la respuesta inmune de la rata en el período post-natal.

En base a ellos podemos afirmar que en la rata, como ocurre en otras especies animales, la adquisición de la capacidad para eleborar una respuesta inmune se desarrolla paulatinamente después del nacimiento.

En general, el nivel es bajo durante los primeros días de vida, va incrementándose con la edad hasta poder ser la rata considerada inmunológicamente adulta a los 3 meses de vida. La magnitud depende del antígeno empleado y del tipo de reacción involucrada.

De los resultados obtenidos se puede concluir que:

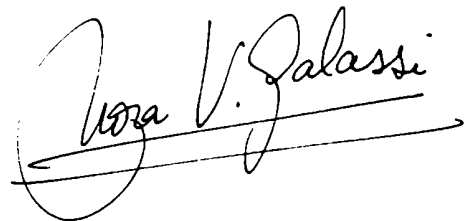
- La respuesta humoral hacia los Ags timo dependientes, ensayados comienza a evidenciarse a los 6 días de vida en el caso de los GRC y a los 2 días para la ASB. Sin embargo, el nivel de respuesta observada en el adulto no se obtiene hasta los 16 días de vida para los GRC y más allá de los 60 para la ASB.
- La respuesta humoral hacia un Ag timo independiente, LPS, va incrementándose permanentemente hasta los 3 meses manifestándose aunque en bajos niveles desde los 7 días de vida.

- La respuesta de base celular, utilizando DNFB como Ag, se logra en los animales de 8 días de vida con magnitud similar a la del animal adulto.
- La capacidad de desarrollar la reacción de hipersensibilidad mediada por Ac, fenómeno de Arthus, se evidencia en el animal de 6 días de vida, cuando se utiliza la oreja para desencadenar la reacción ya que este sitio anatómico ha demostrado ser cien veces más sensible que la piel. Cuando en nuestros estudios se utilizó la clásica reacción cutánea, valores similares a los del animal adulto fueron observados recién a partir de los 60 días de vida.
- Los niveles absolutos de proteínas séricas totales, albúmina α_1 , β y γ -globulinas son bajos durante los primeros días del nacimiento y aumentan con la edad hasta los 3 meses de vida; un hecho similar ocurre en los niveles de complemento sérico. Unicamente la concentración de α_2 -globulina es mayor en el momento del nacimiento con respecto al valor observado en el animal adulto.
- El recuento de leucocitos sanguíneos, linfocitos y polimorfonucleares, son bajos los primeros días de vida, van aumentando con la edad hasta alcanzar los encontrados en la rata de 3 meses, aproximadamente a los 19 días de vida.
- El porcentaje de linfocitos T en timo no varía con la edad,

mientras que en bazo, recién se alcanzan los valores del adulto a los 10 días de vida. Algo similar sucede con los linfocitos B esplénicos, pero en este caso se obtienen a los 13 días de vida.

- La transferencia pasiva natural se realiza principalmente a través de la lactancia. Estos Ac proveerían protección a los recién nacidos hasta que estos adquirieran la capacidad de reaccionar activamente.

Si bien los mecanismos que participan en cada uno de los estudios inmunológicos realizados son complejos y no fueron el objetivo de esta tesis, los estudios realizados demuestran que la rata es inmadura en el momento del nacimiento; que en este período el número de células inmunocompetentes es deficiente; que la competencia inmune es antígeno dependiente y dado que se observan muy pocas variaciones individuales esto parecería ser controlado genéticamente.

A stylized handwritten signature in dark ink, consisting of several fluid, connected strokes.A handwritten signature in dark ink that reads "Jorge V. Galassi". The signature is written in a cursive style and is underlined with a single horizontal stroke.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Longsworth, L.; Curtis, R.; Pembroke, R. Jr. 1945. The electrophoretic analysis of maternal and fetal plasmas and sera. J. Clin. Invest. 24:46.
- 2.- Franek, F.; Riha, I.; Šterzl, J. 1961. Characteristics of γ -globulin, lacking antibody properties, in newborn pigs. Nature 189:1020.
- 3.- Segre, D.; Kaeberle, M. 1962. The immunologic behavior of baby pigs. II. Production of antibodies in newborn pigs. J. Immunol. 89:790.
- 4.- Kim, Y.; Bradley, S.; Watson, D. 1966. Ontogeny of the immune response I. Development of immunoglobulins in germfree and conventional colostrum deprived piglets. J. Immunol. 97:52.
- 5.- Kim, Y.; Bradley, S.; Watson, D. 1967. Ontogeny of the immune response III. Characterization of X-component in germfree, colostrum deprived piglets. J. Immunol. 98:868.
- 6.- Kim, Y.; Bradley, S.; Watson, D. 1968. Ontogeny of the immune response V. Further characterization of 19S- γ G and 7S- γ G immunoglobulins in the true primary immune response in germfree, colostrum deprived piglets. J. Immunol. 101:224.
- 7.- Wolfe, H.; Dilks, E. 1948. Precipitin production in chickens. III. The variation in the antibody response as correlated with the age of the animal. J. Immunol. 58:245.
- 8.- Van Meter, R.; Good, R.; Cooper, M.:1969. Ontogeny of circulating immunoglobulins in normal, bursectomized and irradiated chickens. J. Immunol. 102:370.

- 9.- Leslie, G.; Martin, L. 1973. Modulation of immunoglobulin ontogeny in the chicken: effect of purified antibody specific for μ chain on IgM, IgY and IgA production. J. Immunol. 110: 959.
- 10.- Perey, D.; Bienenstock, J. 1973. Effects of bursectomy and thymectomy on ontogeny of fowl IgA, IgG and IgM. J. Immunol. 111:633.
- 11.- Freund, J. 1930. Influence of age upon antibody formation. J. Immunol. 18:315.
- 12.- Deichmiller, M.; Dixon, F. 1957. Synthesis of serum proteins in the neonatal and developing rabbit. Fed. Proc. 16:410.
- 13.- Šterzl, J.; Trnka, Z. 1957. Effect of very large doses of bacterial antigen on antibody production in newborn rabbits. Nature 179:918.
- 14.- Silverstein, A.; Uhr, J.; Kramer, K.; Lukes, R. 1963. Fetal response to antigenic stimulus. II. Antibody production by the fetal lamb. J. Exp. Med. 117:799.
- 15.- Fennestad, K.; Borg-Petersen, C. 1962. Antibody formation in bovine foetuses infected with Leptospira saxkoebing. Acta Pathol. Microbiol. Scand. Suppl. 154:307.
- 16.- Silverstein, A.; Prendergast, R.; Parshall, Ch. 1970. Cellular kinetics of the antibody response by the fetal Rhesus monkey. J. Immunol. 104:269.
- 17.- Kalmutz, S. 1962. Antibody production in the opossum embryo. Nature 193:851.
- 18.- La Vía, M.; Rowlands, D.; Block, M. 1963. Antibody formation in embryos. Science 140:1219.

- 19.- Rowlands, D.; La Vía, M.; Block, M. 1964. The blood forming tissues and blood of the newborn opossum (Didelphys virginiana). II Ontogenesis of antibody formation to flagella of Salmonella typhi. J. Immunol. 93:157.
- 20.- Rowlands, D.; Blakeslee, D.; Lin, H. 1972. The early immune response and immunoglobulins of opossum embryos. J. Immunol. 108:941.
- 21.- Stelos, P.; Taliaferro, W. 1959. Comparative study of rabbit hemolysins to various antigens. II Hemolysins to the Forssman antigen of guinea pig kidney, human type A red cells and sheep red cells. J. Infect. Dis. 104:105.
- 22.- Uhr, J. 1964. The heterogeneity of the immune response. The quantity and nature of antigen can regulate a variety of immunological functions. Science 145:457.
- 23.- Smith, R.; Eitzman, D. 1964. The development of the immune response. Characterization of the response of the human infant and adult to immunization with Salmonella vaccines. Pediatrics. 33:163.
- 24.- Mark, R.; Dixon, F. 1963. Anti-bovine serum albumin formation by transferred hyperimmune mouse spleen cells. J. Immunol. 91:614.
- 25.- Makinodan, T.; Peterson, W. 1962. Relative antibody-forming capacity of spleen cells as a function of age. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 48:234.
- 26.- Bosma, M.; Makinodan, T.; Walburg, H. 1967. Development of immunologic competence in germfree and conventional mice. J. Immunol. 99:420.
- 27.- Carter, B.; Rector, E. 1972. The generation of antigen sensitive cells in the newborn mouse. J. Immunol. 109:1345.
- 28.- Tyan, M.; Herzenberg, L.; Gibbs, P. 1969. Lymphoid precursors: thymus independent antibody production. J. Immunol. 103:1283.

- 29.- Raybourne, R.; Arnold, L.; Haughton, G. 1981. Perturbation of early development of the immune system by normal adult lymphoid cells. *J. Immunol.* 127:1142.
- 30.- Green, D.; Gershon, R. 1982. Hyperimmunity and the decision to be intolerant. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 392:318.
- 31.- Gershon, R.; Eardley, D.; Durum, S.; Green, D.; Shen, F.; Yamauchi, K.; Cantor, H.; Murphy, D. 1981. Contrasuppression. A novel immunoregulatory activity. *J. Exp. Med.* 153:1533.
- 32.- Sherwin, W.; Rowlands, D. Jr. 1975. Determinants of the hierarchy of humoral immune responsiveness during ontogeny. *J. Immunol.* 115:1549.
- 33.- Sherr, D.; Szewczuk, M.; Siskind, G. 1977. Ontogeny of B lymphocyte function: IV Kinetics of maturation of B lymphocytes from fetal and neonatal mice when transferred into adult irradiated hosts. *J. Immunol.* 119:1674.
- 34.- Rosenberg, Y.; Cunningham, A. 1976. Ontogeny of the antibody-forming cell line in mice: II Maturation of B cells during fetal development. *J. Immunol.* 117:1618.
- 35.- Osborn, J.; Dancis, J.; Julia, J. 1952. Studies of the immunology of the newborn infant. 1. Age and antibody production. *Pediatrics* 9:736.
- 36.- Bradford, W.; Day, E.; Martin, F. 1949. Humoral antibody formation in infants aged one to three months infected with a triple (Diphtheria-Tetanus-Pertussis) alum-precipitated antigen. *Pediatrics* 4:711.
- 37.- Lennette, E.; Magoffin, R.; Schmidt, N. 1962. Observations on the complement-fixing antibody response in human poliomyelitis. Influence of age and vaccination status. *J. Immunol.* 89:358.

- 38.- Vujanovic, N.; Lukic, M.; Jankovic, B. 1972. Appearance, morphology and distribution of lymphocytes during the early development of the chicken embryo. En: L' étude phylogénique et ontogénique de la réponse immunitaire et son apport à la théorie immunologique. Inserm (eds.) Paris p.175.
- 39.- Jotereau, F.; Le Douarin, N. 1982. Demonstration of a cyclic renewal of the lymphocyte precursor cells in the quail thymus during embryonic and perinatal life. J. Immunol. 129:1869.
- 40.- Lassila, O.; Eskola, J.; Toivanen, P. 1979. Prebursal stem cells in the intraembryonic mesenchyme of the chick embryo at 7 days of incubation. J. Immunol. 123:2091.
- 41.- Toivanen, P.; Toivanen, A.; Good, R. 1972. Ontogeny of bursal function in chicken: I Embryonic stem cell for humoral immunity. J. Immunol. 109:1058.
- 42.- Ball, W.; Auerbach, R. 1960. In vitro formation of lymphocytes from embryonic thymus. Exper. Cell. Res. 20:245.
- 43.- Archer, O.; Kelly, W.; Papermaster, B.; Good, R. 1963. Further morphological and immunological studies of the role of the thymus in immunobiology. Federation Proc. 22: 599.
- 44.- Grossi, C.; Lydyard, P.; Cooper, M. 1977. Ontogeny of B cells in the chicken. II Changing patterns of cytoplasmic IgM expression and of modulation requirements for surface IgM by anti- μ antibodies. J. Immunol. 119:749.
- 45.- Lydyard, P.; Grossi, C.; Cooper, M. 1976. Ontogeny of B cells in the chicken. I Sequential development of clonal diversity in the bursa. J. Exp. Med. 144:79.

- 46.- Van Alten, P.; Cain, W.; Good, R.; Cooper, M. 1968. Gamma globulin production and antibody synthesis in chickens bursectomized as embryos. *Nature (London)* 217:358.
- 47.- Kincade, P.; Self, K.; Cooper, M. 1973. Survival and function of bursa derived cells in bursectomized chickens. *Cell. Immunol.* 8: 93.
- 48.- Nossal, G.; Pike, B. 1973. Studies on the differentiation of B lymphocytes in the mouse. *Immunology* 25:33.
- 49.- Owen, J.; Raff, M.; Cooper, M. 1975. Studies on the generation of B lymphocytes in the mouse embryo. *Eur. J. Immunol.* 5:468.
- 50.- Owen, J.; Wright, D.; Habu, S.; Raff, M.; Cooper, M. 1977. Studies on the generation of B lymphocytes in fetal liver and bone marrow. *J. Immunol.* 118:2067.
- 51.- Abney, E.; Cooper, M.; Kearney, J.; Lawton, A.; Parkhouse, R. 1978. Sequential expression of immunoglobulin on developing mouse B lymphocytes: a systematic survey that suggests a model for the generation of immunoglobulin isotype diversity. *J. Immunol.* 120:2041.
- 52.- Calvert, J.; Kim, M.; Gathings, W.; Cooper, M. 1983. Differentiation of B lineage cells from liver of neonatal mice: generation of immunoglobulin isotype diversity in vitro. *J. Immunol.* 131:1693.
- 53.- Mord, J.; Kessler, S.; Finkelman, F.; Paul, W.; Scher, I. 1980. Heterogeneity of Ia expression on normal B cells, neonatal B cells, and on cells from B cell-defective CBA/N mice. *J. Immunol.* 124:1675.
- 54.- Rosenberg, Y.; Parish, Ch. 1977. Ontogeny of the antibody-forming cell line in mice: IV Appearance of cells bearing Fc receptors, complement receptors, and surface immunoglobulin. *J. Immunol.* 118:612.

- 55.- Landreth, K.; Kincade, P.; Lee, G.; Medlock, E. 1983. Phenotypic and functional characterization of murine B lymphocyte precursors isolated from fetal and adult tissues. *J. Immunol.* 131:572.
- 56.- Owen, J.; Ritter, M. 1969. Tissue interaction in the development of thymus lymphocytes. *J. Exp. Med.* 129:431.
- 57.- Tyan, M. 1968. Studies on the ontogeny of the mouse immune system: I Cell-bound immunity. *J. Immunol.* 100:535.
- 58.- Kamarck, M.; Gottlieb, P. 1977. Expression of thymocyte surface allo-antigens in the fetal mouse thymus in vivo and in organ culture. *J. Immunol.* 119:407.
- 59.- Cantor, H.; Boyse, E. 1975. Development and function of subclasses of T cells. *J. Reticuloendoth. Soc.* 17:115.
- 60.- Olson, C.; Hammerling, U.; Abbot, J. 1981. Ontogeny of murine T lymphocytes. II Postnatal appearance and organ distribution of lymphocytes bearing Qa-4 and Qa-5 surface antigens. *Cell. Immunol.* 57:265.
- 61.- Freund, J. 1927. The influence of age on the skin sensitiveness of tuberculous guinea pigs. *J. Immunol.* 13:285.
- 62.- Freund, J. 1929. The sensitiveness of tuberculous guinea pigs one month old to the toxicity of tuberculin. *J. Immunol.* 17:465.
- 63.- Koch, R. 1891. Fortsetzung der mittheilungen über ein heilmittel gegen tuberculose. *Dtsh. Med. Wschr.* 17:101.
- 64.- Salvin, S.; Gregg, M.; Smith, R. 1962. Hypersensitivity in newborn guinea pigs. *J. Exp. Med.* 115:707.

- 65.- Warwick, W.; Good, R.; Smith, R. 1960. Failure of passive transfer of delayed hypersensitivity in the newborn human infant. J. Lab. Clin. Med. 56:139.
- 66.- Warwick, W.; Archer, O.; Good, R. 1960. Passive transfer of delayed sensitivity to newborn rabbit. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 105:459.
- 67.- Schinkel, P.; Ferguson, K. 1953. Skin transplantation in the fetal lamb. Aust. J. Biol. Sci. 6:533.
- 68.- Howard, J.; Michie, D. 1962. Induction of transplantation immunity in the newborn mouse. Transpl. Bull. 29:1.
- 69.- Medawar, P.; Woodruff, M. 1958. The induction of tolerance by skin homografts on newborn rats. Immunology I:27.
- 70.- Cohen, M.; Thorbecke, G.; Hochwald, G.; Jacobson, E. 1963. Induction of graft-versus-host reaction in newborn mice by injection of newborn or adult homologous thymus cells. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 114:242.
- 71.- Goldstein, A.; Arabinda, G.; Howe, M.; White, A. 1971. Ontogenesis of cell-mediated immunity in murine thymocytes and spleen cells and its acceleration by thymosin, a thymic hormone. J. Immunol. 106:773.
- 72.- Sosin, H.; Hilgard, H.; Martinez, C. 1966. The immunologic competence of mouse thymus cells measured by the graft vs. host spleen assay. J. Immunol. 96:189.
- 73.- Howe, M.; Manziello, B. 1972. Ontogenesis of the in vitro response of murine lymphoid cells to cellular antigens and phytoimitogens. J. Immunol. 109:534.

- 74.- Papiernik, M.; Bach, J. 1979. Postnatal development of T cells. I Study of the respective contribution of thymic cellular export, thymic humoral function, and T cell environment. *J. Immunol.* 123:2311.
- 75.- Howe, M.; Cohn, M.; Manziello, B. 1972. Ontogenesis of cellular immune function of murine thymocytes. En: *L' étude phylogénique et ontogénique de la réponse immunitaire et son apport à la théorie immunologique*. Inserm (eds.) Paris p.279.
- 76.- Stobo, J.; Paul, W. 1972. Functional heterogeneity of murine lymphoid cells. II Acquisition of mitogen responsiveness and of θ antigen during the ontogeny of thymocytes and T lymphocytes. *Cell. Immunol.* 4:367.
- 77.- Chiscon, M.; Golub, E. 1972. Functional development of the interacting cells in the immune response: 1 Development of T cell and B cell function. *J. Immunol.* 108:1379.
- 78.- Muraoka, S.; Miller, R. 1983. Cells in murine fetal liver and in lymphoid colonies grown from fetal liver can suppress generation of cytotoxic T lymphocytes directed against their self antigens. *J. Immunol.* 131:45.
- 79.- Oseroff, A.; Okada, S.; Strober, S. 1984. Natural Suppressor (NS) cells found in the spleen of neonatal mice and adult mice given total lymphoid irradiation (TLI) express the null surface phenotype. *J. Immunol.* 132:101.
- 80.- Owen, R. 1945. Immunogenetic consequences of vascular anastomoses between bovine twins. *Science* 102:400.
- 81.- Dresser, D. 1962. Specific inhibition of antibody production. I Protein over-loading paralysis. *Immunology* 5:161.
- 82.- Friedman, H. 1964. Prevention of immunologic unresponsiveness to *Shigella* antigens in neonatal mice by homologous spleen cell transplants. *J. Immunol.* 92:201.

- 83.- Neeper, C. 1964. Mechanisms of immunologic paralysis by pneumococcal polysaccharide. III Immunologic paralysis in relation to maturation of the immunologic response of mice. J. Immunol. 93:860.
- 84.- Nossal, G.; Pike, B. 1975. Evidence for the clonal abortion theory of B-lymphocyte tolerance. J. Exp. Med. 141:904.
- 85.- Nossal, G.; Pike, B. 1978. Mechanisms of clonal abortion tolerogenesis I. Response of immature hapten-specific B lymphocytes. J. Exp. Med. 148:1161.
- 86.- Venkataraman, M.; Scott, D. 1977. Cellular events in tolerance: VI Neonatal vs. Adult B cell tolerance: Differences in antigen-binding cell patterns and lipopolysaccharide stimulation. J. Immunol. 119:1879.
- 87.- Benacerraf, B.; Greene, M.; Sy, M.; Dorf, M. 1982. Suppressor T cell circuits. Ann. N. Y. Acad. Sci. 392:300.
- 88.- Okada, S.; Strober, S. 1982. Spleen cells from adult mice given total lymphoid irradiation (TLI) or from newborn mice have similar regulatory effects in the mixed leukocyte reaction (MLR). II Generation of antigen specific suppressor cells in the MLR after the addition of spleen cells from newborn mice. J. Immunol. 129:1892.
- 89.- Greshwin, M.; Castles, J.; Ahmed, A.; Makishima, R. 1978. The influence of α -fetoprotein on Moloney Sarcoma Virus oncogenesis: evidence for generation of antigen nonspecific suppressor T cells. J. Immunol. 121:2292.
- 90.- Peck, A.; Murgita, R.; Wigzell, H. 1982. Cellular and genetic restrictions in the immunoregulatory activity of α -fetoprotein. III Role of the MLC-stimulating cell population in α -fetoprotein-induced suppression of T cell-mediated cytotoxicity. J. Immunol. 128:1134.

- 91.- Medawar, P. 1954. Some immunological and endocrinological problems raised by the evolution of viviparity in vertebrates. Symp. Soc. Exp. Biol. 7:320.
- 92.- Webb, C.; Gall, W.; Edelman, G. 1977. Synthesis and distribution of H-2 antigens in pre-implantation mouse embryos. J. Exp. Med. 146:923.
- 93.- Bernard, O.; Ripoché, M.; Bennett, D. 1977. Distribution of maternal immunoglobulins in the mouse uterus and embryo in the days after implantation. J. Exp. Med. 145:58.
- 94.- Beer, A.; Billingham, R.; Yang, S. 1972. Further evidence concerning the auto antigenic status of the trophoblast. J. Exp. Med. 135:1177.
- 95.- Winchester, R.; Fu, S.; Wernet, P.; Kunke, H.; Dupont, B.; Jersild, C. 1975. Recognition by pregnancy serums of non-HLA alloantigens selectively expressed on B lymphocytes. J. Exp. Med. 141:924.
- 96.- Kirby, D.; Billington, W.; James, D. 1966. Transplantation of eggs to the kidney and uterus of immunized mice. Transplantation 4:713.
- 97.- Beer, A.; Billingham, R. 1974. Host responses to intra-uterine tissue, cellular and fetal allografts. J. Reprod. Fertil. 21:59.
- 98.- Thompson, J.; Crawford, M.; Reilly, R.; Severson, C. 1967. The effect of estrogenic hormones on immune responses in normal and irradiated mice. J. Immunol. 98:331.
- 99.- Wyle, F.; Kent, J. 1977. Immunosuppression by sex steroid hormones. Clin. Exp. Immunol. 27:407.
- 100.- Kerney, J.; Pangburn, P.; Trail, G. 1976. Effect of estradiol on immune competence: in vivo and in vitro studies. Infect. Immun. 13:448.

- 101.- Murgita, R.; Tomasi, T. 1975. Suppression of the immune response by alpha-fetoprotein. I Primary and secondary response. J. Exp. Med. 141:269.
- 102.- Mc Connell, D.; Loeb, J. 1974. Kallikrein inhibitory capacity of α_2 -macroglobulin subunits. Proc. Exp. Biol. Med. 147:891.
- 103.- Kaliss, N.; Dagg, N. 1964. Immune response engendered in mice by multiparity. Transplantation 2:416.
- 104.- Wegmann, T.; Singh, B.; Carlson, G. 1979. Allogeneic placenta is a paternal strain antigen immunoabsorbent. J. Immunol. 122:270.
- 105.- Wegmann, T.; Mosmann, T.; Carlson, G.; Olijnyk, O.; Singh, B. 1979. The ability of the murine placenta to absorb monoclonal anti-fetal H-2K antibody from the maternal circulation. J. Immunol. 123:1020.
- 106.- Lanman, J.; Herod, L. 1965. Homograft immunity in pregnancy. The placental transfer of cytotoxic antibody in rabbits. J. Exp. Med. 122:579.
- 107.- Gatti, R.; Suedmyr, E.; Leibold, W.; Wigzell, H. 1975. Characterization of a serum inhibitor of MLC reactors. III Specificity. Cell. Immunol. 15:432.
- 108.- Mc Cormick, J.; Faulk, W.; Fox, H.; Fudenberg, H. 1971. Immunohistological and elution studies of the human placenta. J. Exp. Med. 133:1.
- 109.- Chaouat, G.; Voisin, G. 1979. Regulatory T cell subpopulations in pregnancy. I Evidence for suppressive activity of the early phase of MLR. J. Immunol. 122:1383.

- 110.- Kolb, J.; Chaoaut, G.; Chassoux, D. 1984. Immunoactive products of placenta. III Suppression of natural killing activity. J. Immunol. 132:2305.
- 111.- Brambell, R. 1961. The transmission of antibodies from mother to foetus. Problems concerning the transmission of immunity from mother to young. Proc. Roy. Soc. Med. 54:992.
- 112.- Patterson, R.; Youngner, J.; Weigle, W.; Dixon, F. 1962. The metabolism of serum proteins in the hen and chick and secretion of serum proteins by the ovary of the hen. J. Gen. Physiol. 45:501.
- 113.- Tsay, D.; Schlamowitz, M. 1978. Binding of IgG and papain-derived fragments to Fc receptors of the fetal rabbit yolk sac membrane. J. Immunol. 121:520.
- 114.- Hunziker, R.; Gambel, P.; Wegmann, T. 1984. Placenta as a selective barrier to cellular traffic. J. Immunol. 133:667.
- 115.- Stechschulte, D.; Austen, F. 1970. Immunoglobulins of rat colostrum. J. Immunol. 104:1052.
- 116.- Reynolds, H.; Johnson, J. 1970. Canine immunoglobulins. III Distribution of immunoglobulins in colostrum and isolation of secretory IgA and 7S- γ_1 . J. Immunol. 104:1000.
- 117.- Pittard, W. 1979. Breast milk immunology. Am. J. Dis. Child. 133:83.
- 118.- Roux, M.; Mc Williams, M.; Phillips-Quagliata, J.; Weisz-Carrington, P.; Lamm, M. 1977. Origin of IgA secreting plasma cells in the mammary gland. J. Exp. Med. 146:1311.

- 119.- Richie, E.; Steirnetz, K.; Meistrich, M.; Ramirez, I.; Hilliard, J. 1980. T lymphocytes in colostrum and peripheral blood differ in their capacity to form thermostable E-Rosettes. *J. Immunol.* 125:2344.
- 120.- Feldman, J. 1961. Fine structure of cow's udder during gestation and lactation. *Lab. Invest.* 10:238.
- 121.- Jones, E.; Waldmann, T. 1972. The mechanism of intestinal uptake and transcellular transport of IgG in the neonatal rat. *J. Clin. Invest.* 51:2916.
- 122.- Rodewald, R. 1973. Intestinal transport of antibodies in the newborn rat. *J. Cell. Biol.* 58:189.
- 123.- Nagura, H.; Nakane, P.; Brown, W. 1978. Breast milk IgA binds to jejunal epithelium in suckling rats. *J. Immunol.* 120:1333.
- 124.- Cheung, H.; Nadakavukaren, M. 1983. Age- dependent changes in the cellularity and ultrastructure of the spleen of Fischer F344 rats. *Mech. Ageing. Dev.* 22:23.
- 125.- Lowry, O.; Rosenbrogh, N.; Farr, A.; Randall, R. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265.
- 126.- Mancini, G.; Carbonara, A.; Heremans, J. 1965. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry* 2:235.
- 127.- Miyakawa, Y.; Sekine, T.; Shibata, S.; Nishioka, K. 1971. Studies on rat complement: a method for titration of rat C₁, C₂, C₃, C₄ as well as C₅, and the effect of rabbit nephrotoxic serum on the first five components of complement in rat serum. *J. Immunol.* 106:545.

- 128.- Kostiala, A. 1977. Radiometric ear index test as a measure of delayed type hypersensitivity in the rat. *Immunology* 33:561.
- 129.- Watson, D.; Kim, Y. 1963. Modification of host responses to bacterial endotoxins. 1. Specificity of pyrogenic tolerance and the role of hypersensitivity in pyrogenicity, lethality and skin reactivity. *J. Exp. Med.* 118:425.
- 130.- Galassi, N.; Blejer, J.; Barrios, H.; Nejamkis, M.; Nota, N. 1982. New attenuation marker for Junin Virus based on immunologic responses of guinea pigs. *J. Infect. Dis.* 145:331.
- 131.- Dresser, D. 1978. Assays for immunoglobulin-secreting cells. En: *Handbook of experimental immunology*. D. Weir (ed) p. 28.1.
- 132.- Hunt, S. 1978. Separation of lymphocyte sub-populations. En: *Handbook of experimental immunology*. D. Weir (ed) p. 24.1
- 133.- Whitaker, R.; Ruddle, N. 1980. Antigen-specific T-cell hybrids. I. Ovalbumin binding T-cell hybrid. *Cell. Immunol.* 55:56.
- 134.- Ruggiero, R.; Pasqualini, C. 1983. Falta de relación entre la leucemogénesis viral y la inmunodepresión en el ratón. *Rev. Asoc. Argent. Microbiol.* 15:119.
- 135.- Golstein, P.; Blomgren, H. 1973. Further evidence for autonomy of T cells mediating specific in vitro cytotoxicity: Efficiency of very small amounts of highly purified T cells. *Cell. Immunol.* 9:127.
- 136.- Hudson, L.; Hay, F. 1976. *Practical immunology*. Blackwell Scientific Publications, Oxford. p. 44.
- 137.- Crowle, A. 1973. *Immunodiffusion*. Academic Press (New York-London) p. 85.

- 138.- Blejer, J.; Galassi, N.; Nejamkis, M. 1983. Action of antithymocyte serum on Junin virus infection in rats. *Acta Virol.* 27:484.
- 139.- Grabar, P.; Williams, C. 1953. Methode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines. Application au sérum sanguin. *Biochim. Biophys. Acta* 10:193.
- 140.- Ouchterlony, O. 1958. Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. En: *Progress in Allergy*. P. Kallos (Ed.) p. 1.
- 141.- Johnson, G. 1961. Simplified procedure for removing non-specific staining components from fluorescein-labelled conjugates. *Nature (London)* 19:70.
- 142.- Barth, R.; Southworth, J.; Burger, G. 1968. Studies on heterologous anti-lymphocyte and antithymocyte sera. I Serological specificity and immunosuppressive activity of rabbit antimouse sera on the primary immune response. *J. Immunol.* 101:282.
- 143.- Sternberger, L.; Hardy, P.; Cuculis, J.; Meyer, H. 1970. The unlabeled antibody enzyme method of immunochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J. Histochem. Cytochem.* 18:315.
- 144.- Palm, J. 1971. Immunogenetic analysis of Ag-B histocompatibility antigens in rats. *Transplantation* 11:175.
- 145.- Festing, M.; Staats, J. 1973. Standardized nomenclature inbred strains of rats. Fourth listing. *Transplantation* 16:221.
- 146.- Benjamin, D.; Weimer, H. 1963. The antigenic composition of rat serum: an electrophoretic study. *J. Immunol.* 91:331.

- 147.- Jacox, R. 1959. Analysis of the proteins of rat serum by starch electrophoresis and by cationic detergent analysis. I Identification of an unusual globulin. J. Exp. Med. 110:341.
- 148.- Beaton, G.; Selby, A.; Wright, A. 1961. Starch gel electrophoresis of rat serum proteins. I Procedure and designation of components. J. Biol. Chem. 236:2001.
- 149.- Jankovic, B.; Waksman, B.; Arnason, B. 1962. Role of the thymus in immune reactions in rats. I The immunologic response to bovine serum albumin (antibody formation, Arthus reactivity, and delayed hypersensitivity) in rats thymectomized or splenectomized at various times after birth. J. Exp. Med. 116:159.
- 150.- Beaton, G.; Selby, A.; Veen, M.; Wright, A. 1961. Starch gel electrophoresis of rat serum proteins. II Slow α_2 -globulin and other serum proteins in pregnant, tumor-bearing, and young rats. J. Biol. Chem. 236:2005.
- 151.- Hubbard, W. 1978. Alpha-2 Macroglobulin-Enzyme complexes as suppressors of cellular activity. Cell. Immunol. 39:388.
- 152.- Bazin, H.; Beckers, A.; Querinjean, P. 1974. Three classes and four (sub) classes of rat immunoglobulins: IgM, IgA, IgE and IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG_{2c}. Eur. J. Immunol. 4:44.
- 153.- Mc Ghee, J.; Michalek, S.; Ghanta, V. 1975. Rat immunoglobulins in serum and secretions: Purification of rat IgM, IgA and IgG and their quantitation in serum, colostrum, milk and saliva. Immunochemistry 12:817.
- 154.- Murczynska, W.; Andrezejewski, J.; Bogunowicz, A. 1970. Role of macrophages in the development of immunological maturity in rat. Nature 227:721.
- 155.- Rabinowitz, S. 1976. Measurement and comparison of the proliferative and antibody responses of neonatal, immature and adult murine spleen cells to T-dependent and T-independent antigens. Cell. Immunol. 21:201.

- 156.- Argyris, B. 1968. Role of macrophages in immunologic maturation. J. Exp. Med. 128:459.
- 157.- Weiss, A.; Fitch, F. 1978. Suppression of the plaque-forming cell response by macrophages present in the normal rat spleen. J. Immunol. 120:357.
- 158.- Lu, C.; Calamni, E.; Unanue, E. 1979. A defect in the antigen-presenting function of macrophages of neonatal mice. Nature 282:327.
- 159.- Nadler, P.; Klingenstein, R.; Hodes, R. 1980. Ontogeny of murine accessory cells: Ia antigen expression and accessory cell function in "in vitro" primary antibody responses. J. Immunol. 125:914.
- 160.- Snyder, D.; Lu, C.; Unanue, E. 1982. Control of macrophage Ia expression in neonatal mice. Role of a splenic suppressor cell. J. Immunol. 128:1458.
- 161.- Lu, C.; Changelian, P.; Unanue, E. 1984. α -fetoprotein inhibits macrophage expression of Ia antigens. J. Immunol. 132:1722.
- 162.- Argyris, B. 1982. Effect of injection of adult mouse peritoneal macrophages on suppressor cell activity in neonatal mice. Cell. Immunol. 74:313.
- 163.- Morse, H.; Prescott, B.; Cross, S.; Stashak, P.; Baker, P. 1976. Regulation of the antibody response to Type III Pneumococcal Polysaccharide: V Ontogeny of factors influencing the magnitude of the plaque-forming cell response. J. Immunol. 116:279.
- 164.- Argyris, B. 1982. Nature of neonatal splenic suppressor cells in the mouse. Cell. Immunol. 66:352.
- 165.- Bassett, M.; Coons, T.; Wallis, W.; Goldberg, E.; Williams, R. 1977. Suppression of stimulation in mixed leukocyte culture by newborn splenic lymphocytes in the mouse. J. Immunol. 119:1855.

- 166.- Sell, S.; Sheppard, H.; Poler, M. 1977. Effects of α -fetoprotein on murine immune responses. II Studies on rats. J. Immunol. 119:98.
- 167.- Smith, R.; Bridges, R. 1958. Immunological unresponsiveness in rabbits produced by neonatal injection of defined antigens. J. Exp. Med. 108:227.
- 168.- Thorbecke, G.; Siskind, G.; Goldelberg, N. 1961. The induction in mice of sensitization and immunological unresponsiveness by neonatal injection of bovine γ -globulin. J. Immunol. 87:147.
- 169.- Nossal, G. 1958. The induction of immunological tolerance in rats to foreign erythrocytes. Austral. J. Exp. Biol. 36:235.
- 170.- Silverstein, A. 1972. An ontogenetic view of the generation of immunological diversity. En: L'étude phylogénique et ontogénique de la réponse immunitaire et son apport à la théorie immunologique. Inserm (eds.) Paris p.221.
- 171.- Rowlands, D.; Blakeslee, D.; Angala, E. 1974. Acquired immunity in opossum (Didelphis virginiana) embryos. J. Immunol. 112:2148.
- 172.- Haynes, D.; Askenase, P. 1977. Cutaneous basophil responses in neonatal guinea pigs: active immunization, hapten specific transfer with small amounts of serum, and preferential elicitation with phytohemagglutinin skin testing. J. Immunol. 118:1063.
- 173.- Waksman, B.; Matoltsy, M. 1958. Quantitative study of local passive transfer of tuberculin sensitivity with peritoneal exudate cells in the guinea pig. J. Immunol. 81:235.
- 174.- Meng, A.; Pinckard, R.; Haloneu, M. 1973. Ontogeny of the release and reactivity to the mediators of IgE induced acute allergic reactions in the rabbit: the homologous PCA reaction. J. Immunol. 110:1554.

- 175.- Janicki, B.; Aron, S. 1968. Induction of tuberculin hypersensitivity and serologic unresponsiveness to tubercle bacilli in newborn and young guinea pigs. *J. Immunol.* 101:121.
- 176.- Von Eschen, K.; Rudbach, J. 1974. Immunological responses of mice to native protoplasmic polysaccharide and lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* 140:160.
- 177.- Reed, N.; Manning, J.; Rudbach, J. 1973. Immunologic responses of mice to lipopolysaccharide from Escherichia coli. *J. Infect. Dis.* 128 (suppl):570.
- 178.- Fidler, J. 1975. In vivo immune response to TNP hapten coupled to thymus independent carrier lipopolysaccharide. *Cell. Immunol.* 16:223.
- 179.- Hiernaux, J.; Baker, P.; Delisi, C.; Rudbach, J. 1982. Modulation of the immune response to lipopolysaccharide. *J. Immunol.* 128:1054.
- 180.- Mosier, D.; Jhonson, B. 1975. Ontogeny of mouse lymphocyte function. II Development of the ability to produce antibody is modulated by T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 141:216.
- 181.- Uhr, J. 1960. Development of delayed-type hypersensitivity in guinea pig embryo. *Nature* 187:957.
- 182.- Schneider, G. 1973. The ontogeny of cell-mediated immunity: the response of the mouse to dinitrofluorbenzene (DNFB). *Am. J. Anat.* 137:257.
- 183.- Klareskog, L.; Tjernlund, U.; Forsum, U.; Peterson, P. 1977. Epidermal Langerhans cells express Ia antigens. *Nature (London)* 268:248.
- 184.- Silberberg-Sinakin, I.; Baer, R.; Thorbecke, G. 1978. Langerhans cells: A review of their nature with emphasis on their immunologic functions. *Prog. Allergy* 24:268.

- 185.- Huff, T.; Shellhaas, J.; Stelzer, G.; Justus, D.; Wallace, J. 1980. Cultivation and characterization of macrophages from murine embryonic skin. Are they Langerhans cells ? Cell. Immunol. 55:406.
- 186.- Velardi, A.; Cooper, M. 1984. An immunofluorescence analysis of the ontogeny of myeloid, T and B lineage cells in mouse hemopoietic tissues. J. Immunol. 133:672.
- 187.- Spear, P.; Wang, A.; Rutishauser, U.; Edelman, G. 1973. Characterization of splenic lymphoid cells in fetal and newborn mice. J. Exp. Med. 138: 557.
- 188.- Sterzl, J.; Silverstein, A. 1967. Developmental aspects of immunity. In: Advances in Immunology. Academic Press. New York and London. 6:337.
- 189.- Uhr, J.; Baumann, J. 1961. Antibody formation. II The specific anamnestic antibody response. J. Exp. Med. 113:959.
- 190.- Rowley, D.; Fitch, F. 1964. Homeostasis of antibody formation in the adult rat. J. Exp. Med. 120:987.

